

MARLENE DUNAISKI

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA – PARANÁ:
CÃES RESERVATÓRIOS OU HOSPEDEIROS ACIDENTAIS?**

**CURITIBA
2006**

MARLENE DUNAISKI

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA – PARANÁ:
CÃES RESERVATÓRIOS OU HOSPEDEIROS ACIDENTAIS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profª Dra. Vanete T. Soccol
Co-orientadora: Profª Dra. Edilene A. Castro

**CURITIBA
2006**



PARECER


A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Mestranda **MARLENE DUNAISKI**, Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária, após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada “**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA - PARANÁ: CÃES RESERVATÓRIOS OU HOSPEDEIROS ACIDENTAIS?**”, foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata apresentou-se muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.


Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata **APROVADA** concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 29 de agosto de 2006.


Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol
Presidente/Orientadora


Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Membro


Dr. João Carlos Minozzo
Membro


Prof. Dr. Ennio Luz
Membro Suplente

Dedico este trabalho a você, meu querido filho Daniel, que desde sementinha no meu útero já era razão do meu viver. Meu anjo, obrigada por existir e por ter vindo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e pela graça de ter concluído esta etapa.

À professora Dra. Vanete Thomaz Soccol que orientou este trabalho, pela paciência, dedicação, disponibilidade de seu precioso tempo e pelo exemplo de profissional.

À professora Dra. Edilene Alcântara de Castro pela orientação, dedicação e auxílio prestado.

Aos professores Dr. Ennio Luz, Dr. Fabiano Montiani Ferreira e Dr. João Carlos Minozzo pela efetiva colaboração na execução deste, nas sugestões e críticas construtivas.

Aos professores Luiz Carlos Leite e Márcia Oliveira Lopes pela indicação e incentivo.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade da realização deste.

Às Secretárias do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Maria José Botelho Maeda e Natalia Vieira Borges pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu querido filho Daniel, que soube compreender a ausência da mãe durante a realização deste.

Ao Pe. Leocádio José Zytkowski pelo apoio espiritual em todos os momentos.

Ao professor Lourenço Mika pela correção e estímulo constante.

Ao Dr. Alceu Bisetto Júnior, médico da Secretaria Estadual de Saúde, pelo incentivo e colaboração.

Às funcionárias do Laboratório de Parasitologia Luciane, Juliana e Samira pela paciência, dedicação e auxílio prestado.

Aos funcionários das Secretarias Municipais de Saúde e Agricultura dos municípios de Adrianópolis, Cerro Azul e Rio Branco do Sul pela colaboração.

Aos colegas de trabalho da SEAB, principalmente das Unidades Veterinárias de Adrianópolis e Cerro Azul pela ajuda e incentivo.

Ao Médico Veterinário Ademar Golinelli da Unidade Veterinária de Cerro Azul pelo incentivo e colaboração.

Em especial, ao Médico Veterinário Gerson Luiz Lopes Goularte, que na adversidade colaborou efetivamente para a conclusão deste.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

PARECER	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMARIO	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Parasito	04
2.1.1. Forma Amastigota	04
2.1.2. Forma Promastigota	05
2.1.3. Ciclo Biológico	06
2.1.4. Sistemática.....	07
2.2. Hospedeiro Invertebrado	09
2.3. Leishmaniose	10
2.4. Distribuição geográfica dos parasitos e da doença	12
2.5. Diagnóstico.....	13
3. JUSTIFICATIVA	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo Geral	15
4.2. Objetivos Específicos	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1. Área geográfica envolvida no estudo	16
5.1.1. Município de Adrianópolis	17
5.1.2. Município de Cerro Azul	18

5.1.3. Município de Rio Branco do Sul	19
5.2. Coleta de dados epidemiológicos de LTA no Vale do Ribeira.....	20
5.3. Diagnóstico de LTA	20
5.4. Isolamento e Cultivo de <i>Leishmania</i> obtido de lesões de pessoas e de cães.....	20
5.5. Cepas Referências de <i>Leishmania</i>	21
5.6. Recuperação da biomassa de <i>Leishmania</i>	21
5.7. Extração do DNA genômico de <i>Leishmania</i> isolados de lesões de pessoas e de cães.....	21
5.7.1. Quantificação do DNA genômico de <i>Leishmania</i>	22
5.7.2. Reação em Cadeia da Polimease (PCR)	22
5.7.3. Eletroforese	24
5.7.4. Análise dos Produtos de PCR	24
5.7.5. Procedimento de descontaminação	24
5.8. Coleta de sangue de cães.....	24
5.9. Ensaio Imunoenzimático – ELISA	25
5.9.1. Sensibilização da Placa	25
5.9.2. Primeira Lavagem	25
5.9.3. Bloqueio da Placa	25
5.9.4. Segunda Lavagem	26
5.9.5. Diluição dos Soros	26
5.9.6. Terceira Lavagem	26
5.9.7. Diluição do Conjugado	26
5.9.8. Quarta Lavagem.....	26
5.9.9. Substrato	27
5.9.10. Parada da Reação	27
5.9.11. Leitura	27
5.9.12. Nível de Corte entre positivos e negativos <i>Cut-off</i> do Ensaio Imunoenzimático ELISA.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Município de Adrianópolis	28
6.2. Município de Cerro Azul	30

6.3. Município de Rio Branco do Sul	35
6.4. Cepas isoladas de pessoas e de cães portadores de lesões cutâneas	38
6.5. Identificação das cepas de <i>Leishmania</i> isoladas usando a técnica de PCR	38
6.6. Ensaio Imunoenzimático – ELISA	40
6.6.1. Município de Adrianópolis	41
6.6.2. Município de Cerro Azul	42
6.6.3. Município de Rio Branco do Sul	43
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÕES	47
9. REFERENCIAS.....	48
10. ANEXOS	51
Anexo 1. Ficha Individual de Notificação – SESA	52
Anexo 2. Mapa do Município de Adrianópolis	53
Anexo 3. Mapa do Município de Cerro Azul	54
Anexo 4. Mapa do Município de Rio Branco do Sul	55
Anexo 5. Resultados Teste Qui Quadrado nos Cães Examinados	56

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Classificação das espécies pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	08
TABELA II. Formas Clínicas de Leishmaniose	11
TABELA III. Cepas Referências de <i>Leishmania</i>	21
TABELA IV. Condições de Amplificação de DNA de cepas de <i>Leishmania</i> isoladas de pessoas e cães, usando os iniciadores b1 e b2.....	23
TABELA V. Condições de Amplificação para os iniciadores a1 e a2 (Metodologia adaptada de MIMORI et al., 1998	23
TABELA VI. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Adrianópolis, no período 2001 -2006	28
TABELA VII. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, de acordo com o sexo, no município de Adrianópolis, no período de 2001 - 2006	29
TABELA VIII. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por localidades, no município de Adrianópolis, no período 2001 - 2006	30
TABELA IX. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Cerro Azul, no período 2001 - 2006.....	31
TABELA X. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, de acordo com o sexo, no município de Cerro Azul, no período 2001 - 2006I.....	32
TABELA XI. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por localidades, no município de Cerro Azul, no período 2001 - 2006.....	33
TABELA XII. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 - 2006	35
TABELA XIII. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, de acordo com o sexo, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 -2006	36
TABELA XIV. Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por localidades, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 - 2006	37
TABELA XV. Lista de isolados obtidos de pacientes humanos e de cães com lesões compatíveis para LTA de Adrianópolis, Cerro Azul e Rio Branco do Sul	38
TABELA XVI. Detecção de anticorpos contra <i>Leishmania</i> pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães dos Municípios do Vale do Ribeira	41

TABELA XVII. Detecção de anticorpos contra <i>Leishmania</i> pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do Município de Adrianópolis	42
TABELA XVIII. Detecção de anticorpos contra <i>Leishmania</i> pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do Município de Cerro Azul	42
TABELA XIX. Detecção de anticorpos contra <i>Leishmania</i> pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do Município de Rio Branco do Sul	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Leishmania</i> na Forma Amastigota	05
FIGURA 2. <i>Leishmania</i> na Forma Promastigota	06
FIGURA 3. Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i>	07
FIGURA 4. <i>Lutzomia</i> sp	10
FIGURA 5. Áreas de Incidência de Leishmaniose	12
FIGURA 6. Localização Geográfica da Região do Vale do Ribeira	16
FIGURA 7. Mapa do Estado do Paraná com destaque para Adrianópolis.....	17
FIGURA 8. Mapa do Estado do Paraná com destaque para Cerro Azul	18
FIGURA 9. Mapa do Estado do Paraná com destaque para Rio Branco do Sul.....	19
FIGURA 10. Distribuição da LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Adrianópolis, no período 2001 - 2006	29
FIGURA 11. Distribuição dos casos de LTA segundo o sexo dos pacientes, no município de Adrianópolis, em percentagem, período 2001 - 2006.....	29
FIGURA 12. Distribuição da LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Cerro Azul, no período 2001 - 2006	31
FIGURA 13. Distribuição dos casos de LTA segundo o sexo dos pacientes, no município de Cerro Azul, em percentagem, período 2001 - 2006	32
FIGURA 14. Distribuição da LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 - 2006	36
FIGURA 15. Distribuição dos casos de LTA segundo o sexo dos pacientes, no município de Rio Branco do Sul, em percentagem, período 2001 - 2006	37
FIGURA 16. Produtos de Amplificação de DNA de cepas de <i>Leishmania</i> pela Técnica de PCR, usando o par de iniciadores b1 e b2, proposto por MIMORI et al., 1998.....	39
FIGURA 17. Eletroforese em gel de agarose 1,6% dos produtos da PCR das cepas de <i>Leishmania</i> usando os iniciadores a1 e a2	40
FIGURA 18. Cão com lesões de mucosa nasal causado por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	46

LISTA DE SIGLAS

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MS - Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - Substrato ortofenilenodiamino

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

RESUMO

Leishmaniose é uma das principais parasitoses negligenciadas e emergentes no Mundo e no Brasil. Nos últimos anos tem chamado a atenção das autoridades da saúde pelo aumento do número de casos em todas as regiões do país. Em função do aparecimento da Leishmaniose Tegumentar em novas áreas no Estado do Paraná, buscou-se conhecer a situação desta zoonose em uma área endêmica de LTA e uma área epidêmica no Vale da Ribeira. Como área endêmica foi estudada, a doença, no Município de Adrianópolis e como áreas epidêmicas os Municípios Cerro Azul e Rio Branco do Sul. No período janeiro de 2001 a maio de 2006 foram notificados 286 casos humanos da doença pelas secretarias municipais de saúde nos três municípios estudados. Na análise epidemiológica, referente ao sexo observou-se predomínio para sexo masculino, com 54,28% dos pacientes no município de Adrianópolis e 53,64% em Cerro Azul. No entanto, em Rio Branco do Sul observou-se que 53,85% dos casos eram pacientes do sexo feminino. A faixa etária predominante, no município de Adrianópolis, foram os indivíduos de 11 a 20 anos e de 31 a 40 anos. Em Cerro Azul os indivíduos de 0 a 20 anos possuem o maior número de casos notificados e em Rio Branco do Sul a faixa etária predominante foi de 0 a 10 anos. As cepas de *Leishmania* isoladas de pacientes com lesões cutâneas foram identificadas e caracterizadas por biologia molecular, como pertencentes à espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para evidenciar o papel do cão na manutenção do ciclo da leishmaniose no Vale da Ribeira foram examinadas 299 amostras de soros de animais oriundos de localidades onde havia o registro de casos humanos. Quarenta e cinco cães examinados apresentaram sorologia positiva quando submetidos ao antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* usando a técnica Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Em Adrianópolis o percentual de animais soro-reagentes foi de 14,28%, em Cerro Azul 14,28% e em Rio Branco do Sul 16,85%, não mostrando diferença estatística significativa entre áreas epidêmica e endêmica de transmissão. Foi encontrado apenas um cão, na localidade Laranjal, município de Adrianópolis, com lesões compatíveis com a doença na forma cutâneo-mucosa. Após o isolamento, a identificação da cepa por PCR mostrou-se tratar de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Neste trabalho não foi evidenciado fatores que

associem ao cão uma possível manutenção do parasita e conseqüente contaminação do vetor e transmissão para humanos.

Palavras chave: Zoonose, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Ensaio Imunoenzimático - ELISA

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the main emergent and careless parasitosis in the world, including Brazil. In the last few years it has called attention of the health authorities due to the increasing number of cases registered in all regions of the country. The knowledge of this zoonosis in American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) endemic and epidemic areas of Vale do Ribeira became necessary since new cases of Tegumentary Leishmaniasis have emerged in Paraná State. As an endemic area the disease was studied in Adrianópolis municipalities and as epidemic area, two municipalities were chosen, Cerro Azul e Rio Branco do Sul. From January 2001 to May 2006 a number of 286 cases of this disease in humans was notified by the official local health authorities in the three evaluated municipalities. An epidemiological analysis pointed that the predominance of patients were males, with percentage of 54.28% in Adrianópolis and 53.64% in Cerro Azul. On the other hand, in Rio Branco do Sul the predominance of the cases was of females patients with 53,85%. The predominant age intervals of patients in Adrianópolis were from 11 to 20 and 31 to 40 years old. In Cerro Azul the majority notified patient cases were from 0 to 20 years old, and in Rio Branco do Sul the predominant age interval was from 0 to 10. *Leishmania* strains isolated from patients with cutaneous lesion were identified and characterized by molecular method as being the species *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In order to characterize the role of the dogs in the maintenance of Leishmaniasis cycle in Vale da Ribeira, 299 dog serum samples, from the same places where human cases were notified, were also examined. A total of 45 examined dogs reacted positively front to *Leishmania (V.) braziliensis* antigen by ELISA assay. In Adrianópolis the percentage of serum-reactive animals were of 14.28%, in Cerro Azul were also of 14.28% and in Rio Branco do Sul were of 16, 85%. Statistical differences among these percentages were not evidenced among epidemic and endemic areas of transmission. Only one dog, from Laranjal site at Adrianópolis, presented lesions compatible with the disease being diagnosticated as mucocutaneous. After the isolation, the strain was identified as *Leishmania (V.) braziliensis* by PCR method. In the present work it was not evidenced any factor in

which the dog could be associate to the maintaining of the parasite and consequent contamination of the vector and transmission to humans.

Key-words – Zoonosis, American Tegumentary Leishmaniosis (ATL), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é causada por um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. Este protozoário é digenético e se apresenta sob duas formas: uma flagelada denominada promastigota, que é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais. A outra forma é aflagelada denominada de amastigota, que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados. O modo de transmissão habitual do protozoário é através da picada de insetos vetores, pertencentes a várias espécies de flebotomíneos.

É uma infecção zoonótica que afeta animais selvagens, animais domésticos e o homem. Os animais selvagens representam os verdadeiros reservatórios, enquanto o homem é considerado um hospedeiro acidental. O período de incubação da doença no homem é, em média de dois meses, podendo apresentar períodos mais curtos (duas semanas) ou mais longos (dois anos). O protozoário, ao infectar o hospedeiro vertebrado causa a Leishmaniose. Três tipos de leishmaniose são descritos: a leishmaniose visceral, de distribuição mundial, a leishmaniose tegumentar e cutâneo-mucosa do Novo Mundo e a leishmaniose cutânea do Velho Mundo. A leishmaniose visceral é grave e até mesmo fatal, na ausência de terapêutica. A leishmaniose cutâneo-mucosa caracteriza-se por apresentar metástases graves e mutilantes (OMS-1990; BARRAL et al., 1991; MODABBER, 1993).

A Leishmaniose tem distribuição mundial, com um número estimado de 350 milhões de pessoas vivendo em regiões endêmicas e correndo o risco de contrair a doença (OMS -1990).

No Novo Mundo, o gênero *Leishmania* ocorre desde a península de Yucatã, no México até o norte da Argentina, por onde se distribuem pelo menos 17 táxons, causando diversas formas clínico-epidemiológicas (THOMAZ-SOCCOL, 1993; DEDET et al, 1993). Destes, 10 são assinalados no homem. Quanto maior a diversidade de vetores e reservatórios, maior o número de táxons que pode ser encontrado no mesmo foco. No Brasil, existe uma grande variedade de espécies do protozoário e a doença apresenta-se como uma zoonose em franca expansão geográfica, sendo uma das infecções dermatológicas mais

importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e seqüelas que podem acarretar.

Em algumas regiões do Brasil e da Amazônia legal há um grande número de espécies do protozoário circulando em simpatria, enquanto que em outras apenas uma ou duas espécies foram registradas (LAINSON e SHAW, 1972; SILVEIRA et al., 1987; LAINSON et al., 1989; LAINSON e SHAW, 1989; GRINALDI et al., 1989; SILVEIRA et al., 1990; YOSHIDA et al., 1990; LAISON et al., 1994, BUSATO et al. 1999, CASTRO et al., 2002, CASTRO et al., 2005).

Segundo a FUNASA (2000), a Leishmaniose tem ampla distribuição do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a transmissão ocorre em áreas de terra firme. Os hospedeiros naturais são desconhecidos e o único vetor encontrado parasitado foi o flebotomíneo *Psychodopigus wellcomei*, encontrado na Serra dos Carajás. Este é altamente antropofílico, tem como hábito picar o homem mesmo durante o dia e apresenta grande atividade na estação das chuvas.

Em outras regiões do país, em áreas de colonização antiga, onde o ambiente se encontra profundamente modificado, ainda é *L. (Viannia) braziliensis* o agente mais freqüentemente encontrado, que de acordo com a distribuição das diversas espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão, assumiu características epidemiológicas distintas no decorrer do tempo (FUNASA, 2000).

Na Mata Atlântica, *L.(V.) braziliensis* encontra-se associada à *Lutzomyia intermedia* nas áreas endêmicas litorâneas dos estados do Espírito Santo (Viana), Rio de Janeiro (capital e interior) e São Paulo (Vale do Ribeira), assim como nos vales de grandes rios do interior de São Paulo, onde o vetor é encontrado dentro e ao redor das habitações e em abrigos de animais domésticos (FUNASA, 2000).

A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas se explica por vários fatores, entre eles a grande diversidade do agente etiológico, grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores, e de mais de uma centena de espécies de animais que podem ser reservatórios (OMS -1990). Além disso, são necessários estudos epidemiológicos para investigar os fatores ligados à identificação do agente etiológico, dos vetores e dos reservatórios para que se conheça o problema e poder propor medidas de controle.

A leishmaniose vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica apresentando diferentes padrões de transmissão, relacionados não somente à penetração do homem em focos silvestres, mas freqüentemente ocorre em áreas de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a presença da doença em áreas de colonização antiga. Nestas, é possível que tenha havido adaptação dos vetores e reservatórios a ambientes modificados. A doença é um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Parasito

Leishmania são seres unicelulares eucarióticos, parasitos pertencentes ao Reino Protista. As diferentes espécies são bastante semelhantes quanto aos caracteres morfológicos, muitas vezes indistinguíveis.

Apresentam como hospedeiros vertebrados diversos animais selvagens e domésticos, e o próprio homem. Os hospedeiros invertebrados são mosquitos dos gêneros *Lutzomyia* para o Novo Mundo e *Phlebotomus* para o Velho. Em ambos hospedeiros o parasito é capaz de se multiplicar assexuadamente por divisão binária.

Apresentam duas formas bem definidas e diferenciadas: amastigota e promastigota.

2.1.1. Forma Amastigota

Possui forma esférica e aflagelada, de 2,5 a 5 µm de diâmetro, e não possui mobilidade. É a forma encontrada parasitando intracelularmente as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado. Mais especificamente, seus habitats são os vacúolos digestivos (fagossomos) de macrófagos que os fagocitam. O núcleo ocupa metade ou dois terços do corpo celular. Quase sempre tangente a ele, encontra-se o cinetoplasto, de aspecto baciliforme, reto ou curvo. A mitocôndria, provida de septos internos regulares e pouco numerosos, mostra continuidade com a parede do cinetoplasto. Apresenta ainda, no seu interior, um curto flagelo e o blefaroplasto, complexo de golgi e retículo endoplasmático pouco abundante.

Os protozoários reproduzem-se por divisão binária simples, longitudinal, notando-se primeiro a divisão do cinetoplasto em dois, um conservando o antigo flagelo e outro produzindo nova estrutura. Segue-se com a divisão do núcleo e, por fim, a divisão do citossomo.

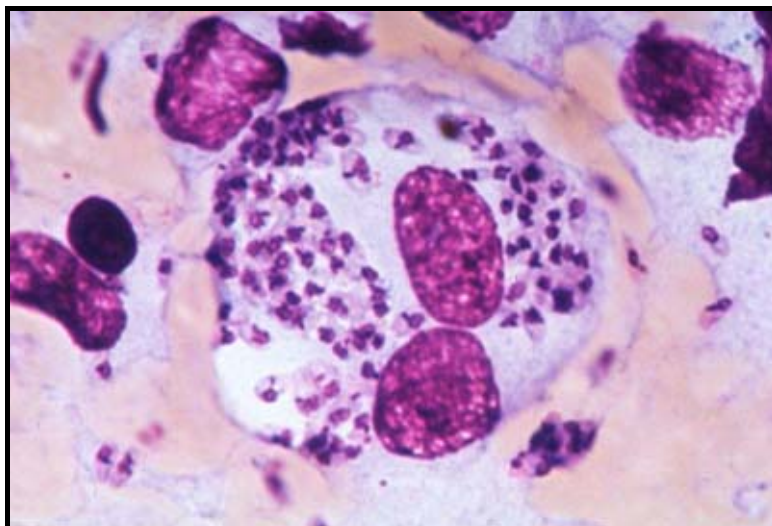


Figura 1 – *Leishmania* na Forma Amastigota (células coradas por May Grunwald Giemsa)

2.1.2. Forma Promastigota

Possui forma alongada, com 10 a 20 μm de comprimento, e espessura entre 1,5 e 3 μm , apresentando a extremidade anterior arredondada e a posterior mais fina. O flagelo evidente confere mobilidade à célula flexível. É encontrada no intestino do inseto vetor.

Quando a forma amastigota diferencia-se nesta forma, observa-se o desenvolvimento da mitocôndria, que parece expandir-se a partir da parede do cinetoplasto. O núcleo torna-se maior, o aparelho de golgi mais evidente e o retículo endoplasmático mais abundante. A estrutura dos filamentos de kDNA dentro do cinetoplasto passa a ser mais frouxa, mas este conserva o aspecto.

A transformação morfogênética entre a forma amastigota e promastigota dura entre 12 e 23 horas.



Figura 2 – *Leishmania* na Forma Promastigota.

2.1.3. Ciclo Biológico

A forma promastigota é inoculada nos hospedeiros vertebrados pela picada do mosquito vetor. As formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e retornam à forma amastigota intracelular. Esta forma replica-se no interior dos fagossomos, até que pela grande quantidade e danos causados à célula hospedeira, esta é lisada e os parasitos são liberados no meio intercelular, para serem novamente fagocitados.

A picada do flebotomíneo (vetor) em indivíduo parasitado retira com o sangue ou linfa intersticial, células dos parasitos, que passam a evoluir em seu tubo digestivo. Os protozoários, na forma amastigota, passam à forma promastigota. No intestino do inseto ocorre intensa atividade multiplicadora, e os parasitos agrupam-se em formas com aspecto de rosáceas.

Aumentando seu número, invadem as porções anteriores do estômago e o proventrículo do mosquito, onde a concentração parasitária pode causar obstrução mecânica e dificultar a ingestão de sangue pelo inseto. Depois de cada esforço para a ingestão de sangue, os músculos encarregados pela sucção relaxam e causam regurgitação do material aspirado, misturado aos parasitos

presentes no local. Assim fica assegurada a inoculação de formas infectantes em novo hospedeiro.

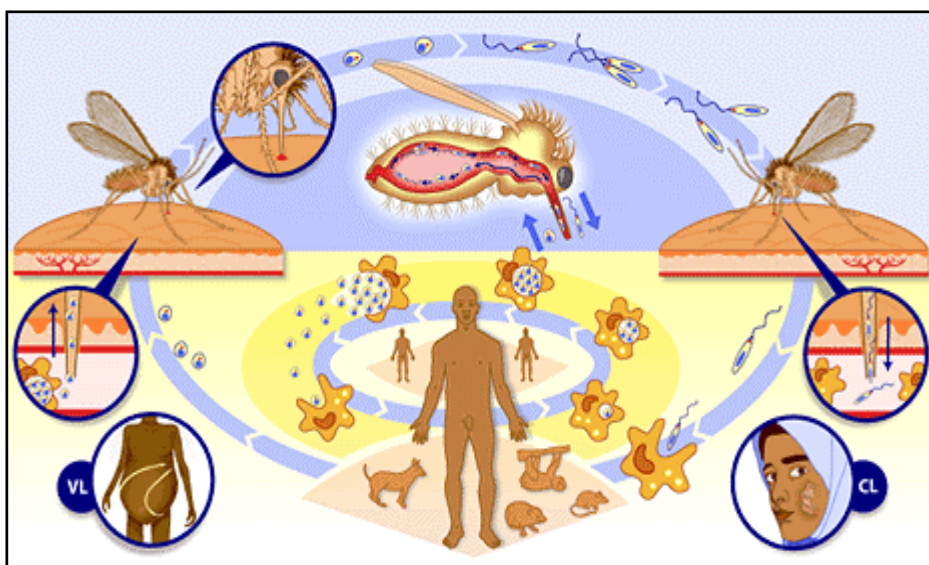


Figura 3 – Ciclo Biológico da *Leishmania*.

(LV – Leishmaniose visceral, LTA – Leishmaniose cutânea)

Fonte: WHO/TDR 2004

2.1.4. Sistemática

Este protozoário pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (REY, 1991).

Entre os parasitos pertencentes a este gênero há forte semelhança morfológica. Porém, observa-se grande diversidade de característica clínicas e epidemiológicas. Por esta razão a classificação foi elaborada fundamentalmente levando em conta a doença produzida, apoiada por características biológicas, geográficas, epidemiológicas e caracteres moleculares. Atualmente a classificação do protozoário aceita divide o gênero em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* e vários complexos filogenéticos (ver tabela I).

Tabela I – Classificação das espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*.

Subgênero *Viannia*

Distribuição limitada à Região Neotropical

Leishmania (V.) braziliensis – Ampla distribuição no Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, América Central e áreas florestais dos Andes. Forma úlceras cutâneas (raramente múltiplas), expansivas e persistentes, freqüentemente acompanhadas de lesões nasofaringianas destrutivas e desfigurantes. A doença recebe o nome de leishmaniose cutâneo-mucosa, espúndia, úlcera de Bauru e ferida brava.

Leishmania (V.) guyanensis – Presente na Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil. Causa ulcerações simples ou múltiplas, com metástases ao longo do trajetos linfáticos, mas parece não atacar mucosas.

Leishmania (V.) panamensis – Encontrada no Panamá, porém deve ocupar outras regiões. Produz lesões únicas ou pouco numerosas e metástases nodulares ao longo dos vasos linfáticos, ataca as mucosas.

Leishmania (V.) peruviana – Causa a “uta”, distinguida das demais leishmanioses americanas por encontrar-se longe das áreas florestais, em vales muitos elevados e secos das vertentes ocidentais dos Andes, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela. Lembra clinicamente a leishmaniose cutânea do Médio Oriente, porém os estudos ainda não permitem classificá-lo adequadamente.

Leishmania (V.) lainsoni - Responsáveis por casos de leishmaniose tegumentar e foi assinalada na região norte do Brasil e Região andina do Peru.

Leishmania (V.) naiffii - Também causam a forma tegumentar e é assinalada na região amazônica do Brasil.

Tabela I – Classificação das espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* (continuação).

Subgênero *Leishmania*

Distribuição nos continentes europeu, asiático, americano e africano.

Leishmania (L.) mexicana – Encontrada no México, Guatemala e Belise, como zoonose florestal. Causa úlceras benignas da pele, geralmente únicas e com tendência para a cura espontânea. Com frequência (em 60% dos casos), produz ulcerações ns orelhas, que costumam ter um curso crônico.

Leishmania (L.) amazonensis – Presente na Bacia Amazônica, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, Colômbia, Panamá e Trinidad (Antilhas). É uma zoonose de pequenos roedores silvestres, e raramente atinge o homem. Provoca lesões cutâneas únicas ou em pequeno número, que poucas vezes se curam espontaneamente. Não dá metástases mucosas, estando muito relacionada com a leishmaniose cutâneo-difusa ou forma anérgica (disseminada) da doença, em indivíduos com deficiência inata da resposta imune.

Leishmania (L.) chagasi (sinonímia *L.(L.) infantum*) - Afeta crianças e adultos, tem como reservatório cães Domésticos, canídeos silvestres e até mesmo gambás.

2.2. Hospedeiro Invertebrado

Os parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada de mosquitos flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*). Nas Américas os vetores são pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. Na África, Europa e Ásia o gênero dos vetores é *Phlebotomus*.

São conhecidos no Brasil por “cangalha”, “cangalhingá”, “orelha-de-veado”, “asa dura”, “mosquito-palha”, “birigui”, e “tatuíra”.

São mosquitos de corpo bastante piloso, mantendo-se em posição característica quando pousados, com as asas entreabertas e ligeiramente levantadas.



Figura 4 - *Lutzomyia* sp (adulto).

Fonte: www.micromacro.co.uk/.../parasitology/sc3008.htm

De cerca de 500 espécies conhecidas, apenas 30 delas foram identificadas positivamente como vetores da doença (Leishmaniasis control, WHO/TDR 2004).

2.3. Leishmaniose

As leishmanioses apresentam um amplo espectro clínico e nosogeográfico. No Novo Mundo são divididas em quatro formas: Leishmaniose cutânea, Leishmaniose cutâneo mucosa, Leishmaniose cutânea difusa e Leishmaniose visceral. (Tabela II).

Tabela II – Formas Clínicas de Leishmaniose

Leishmaniose Cutânea	Leishmaniose cutânea produz lesões na pele. Primordialmente no rosto, braços e pernas. Apesar desta forma ser freqüentemente auto-curativa, pode criar sérias incapacitações e cicatrizes permanentes. Após a recuperação por tratamento com sucesso, a leishmaniose cutânea induz imunidade à re-infecção às espécies de <i>Leishmania</i> que causam a doença. A forma cutânea representa 50 a 75% dos casos.
Leishmaniose Cutânea difusa	A leishmaniose cutânea difusa tem difícil tratamento devido às lesões disseminadas que se assemelham à hanseníase e não tem cura espontânea. Esta forma em particular está relacionada a um sistema imune defeituoso, e é caracterizada por apresentar em alguns casos, recaídas após o tratamento.
Leishmaniose cutâneo mucosa	A leishmaniose cutâneo mucosa, também conhecida como espúndia na América do Sul, causa lesões desfigurantes na face, destrói as membranas mucosas do nariz, boca e garganta. A cirurgia reconstrutiva das deformidades é um importante passo da terapia.
Leishmaniose visceral	A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é caracterizada por febres irregulares, perda de peso, hipertrofia do fígado e baço e anemia. É a forma mais severa das leishmanioses, é freqüentemente fatal se não tratada. O período de incubação pode ter meses ou anos.

Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infection - WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - 2004)

2.4. Distribuição Geográfica dos Parasitos e da Doença.

As leishmanioses se fazem presentes em 88 países, 72 dos quais em desenvolvimento ou terceiro mundo. 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e 90% dos casos da forma cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. Por sua vez a forma mucocutânea está presente em países como a Bolívia, Brasil e Peru. (Programme for the surveillance and control of leishmaniasis).

Estima-se a existência de 12 milhões de casos no mundo, com algo entre 1,5 e 2 milhões de casos novos anuais, sendo 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos da forma visceral. 350 milhões de pessoas sofrem o risco de contrair a doença (Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infection - WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - 2004).



Figura 5 – Áreas de Incidência de Leishmaniose.

Fonte: WHO/TDR 2004

No Brasil foram registrados 36.601 casos de leishmaniose cutânea em 2001, e 2.754 casos de leishmaniose visceral, no mesmo ano. O estado do Paraná responde por quase a totalidade dos casos registrados na região sul do país (Relatório da FUNASA – Ministério da Saúde). Anualmente são registrados em torno de 600 novos casos com anos apresentando brotes epidêmicos como em 2002 sendo registrados 1.250 casos.

2.5. Diagnóstico

A disseminação da doença persiste devido às restrições técnicas, financeiras, políticas e de administração. Uma das razões para isto é que não existe um pacote custo-efetivo de controle. Mesmo que as ferramentas de controle tenham sido consideravelmente desenvolvidas nos últimos anos, está muito longe do que se pode considerar ideal (TDR Strategic Direction: Leishmaniasis - 2004).

Os métodos de diagnóstico estão inseridos neste contexto, sendo seu aperfeiçoamento extremamente importante para a agilização do tratamento e considerável melhora na sua eficácia.

As ferramentas existentes para diagnóstico sorológico ("ELISA" e imunofluorescência) são difíceis de descentralizar, o teste de aglutinação direta pode ser usado em "campo", mas existem problemas de transporte e armazenamento do antígeno intacto. As técnicas para exames parasitológicos são normalmente invasivos (aspirados de medula óssea e baço) e de baixa sensibilidade (TDR Strategic Direction: Leishmaniasis - 2004). Existem ainda exames indiretos, através de análises como proporção de proteínas no sangue (relação albumina/globulina), porém incapazes de precisar o diagnóstico. O ensaio imunoenzimático ELISA é eficiente para ser utilizado em levantamentos epidemiológicos com sensibilidade de 90 a 95% (Castro et al., 2005).

A PCR surge como nova alternativa para diagnóstico, aliando grande sensibilidade e especificidade, provendo resultados seguros apoiados na existência de marcadores genéticos de espécies. Apresenta a grande vantagem quanto ao modo de coleta do material para a análise. É possível a utilização de sangue periférico, tornando o método menos invasivo e a coleta mais fácil. O resultado da análise pode ser obtido até 48h após a coleta de material (FISA et al., 2001).

3. JUSTIFICATIVA

A região do Vale do Ribeira do Iguape, Paraná, apresenta relatos de casos de leishmaniose tegumentar desde 1955, ano em que houve o registro na literatura de seis casos no Município de Adrianópolis por MIRANDA et al., 1955. Em 1978, ROCHA & SILVA et al. citaram 32 casos de leishmaniose oriundos de Adrianópolis e diagnosticados e tratados pela Superintendência de Controle de Endemias – (SUCEN de São Paulo). CASTRO, 2001 em trabalho epidemiológico realizado na região relata no período de 1993 a 1997 setenta e dois casos de leishmaniose tegumentar. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde, de 1994 a 2006 foi registrado um total de cento e dez casos no município de Adrianópolis. (Dados até o mês de maio 2006). Para os demais municípios da região não havia registro e somente a partir do ano de 2000 foram observados os primeiros casos. Pouco se conhece da epidemiologia da leishmaniose tegumentar nesses focos. As características epidemiológicas e estratégias devem ser adequadas a cada região ou foco particular (MS/FNS – 1994).

Na região do vale do Ribeira, Castro et al., 2001 assinalam o isolamento e caracterização de três cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de pacientes com lesões cutâneas. Apesar de não terem sido encontrados animais silvestres e flebotomíneos infectados, não se pode ainda descartar a ocorrência de um ciclo silvestre nesta região, porque um pequeno número de animais silvestres foi capturado. É necessário determinar o real papel do cão na manutenção do ciclo desta parasitose. Para isso, mais estudos com a observação de cães naturalmente infectados devem ser realizados para avaliar o cão como fonte de infecção para os flebotomíneos uma vez que não foi possível isolar o parasita de outros locais além da lesão (CASTRO, 2001).

Para incriminar o cão como reservatório, primeiramente, deve se isolar o parasito da corrente sanguínea ou dos órgãos linfáticos, pois para infectar o flebotomíneo, o parasito deve estar na corrente sanguínea, uma vez que o número de amastigotas nas lesões é pequeno e não representaria maiores riscos. Além disso, o cão deve apresentar a mesma espécie de *Leishmania* encontrada em pacientes e vetores e todos estarem em simpatria.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Conhecer o perfil epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na Região do Vale do Ribeira, nos municípios de Adrianópolis, Cerro Azul e Rio Branco do Sul.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil epidemiológico da LTA na população humana, por sexo e idade, nas diferentes localidades, nos três municípios estudados.

Determinar o perfil epidemiológico da LTA na população canina.

Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* parasito diagnosticados em pessoas e cães.

Realizar pesquisa de anticorpos contra *Leishmania sp* nos soros de cães que vivem nas áreas de transmissão.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área geográfica envolvida no estudo

A região do Vale do Ribeira, onde foi realizado o presente estudo, localiza-se na parte norte do primeiro planalto paranaense, na divisa com o estado de São Paulo (figura 6). Possui uma rede hidrográfica bastante densa que vai a direção do Oceano Atlântico pelo Rio Ribeira do Iguape. Esta rede hidrográfica é formada por rios encaixados e movimentados, produzindo um cenário típico da região. Nesta, encontram-se as nascentes dos principais rios formadores do Rio Ribeira, como o Rio Capivari e o Rio Açungui. Apresenta clima Subtropical Úmido Mesotérmico, com verões quentes com tendência de concentração de chuvas (temperatura média superior a 22° C), e invernos com geadas pouco freqüentes (temperatura média inferior a 18° C), sem estação seca definida. A cobertura vegetal original, hoje está quase totalmente desaparecida, sendo substituída pela vegetação resultante da ação do homem sobre a vegetação natural, bananais, agricultura de subsistência como milho, feijão, mandioca, reflorestamento de *pinus*, pecuária e cítricos.

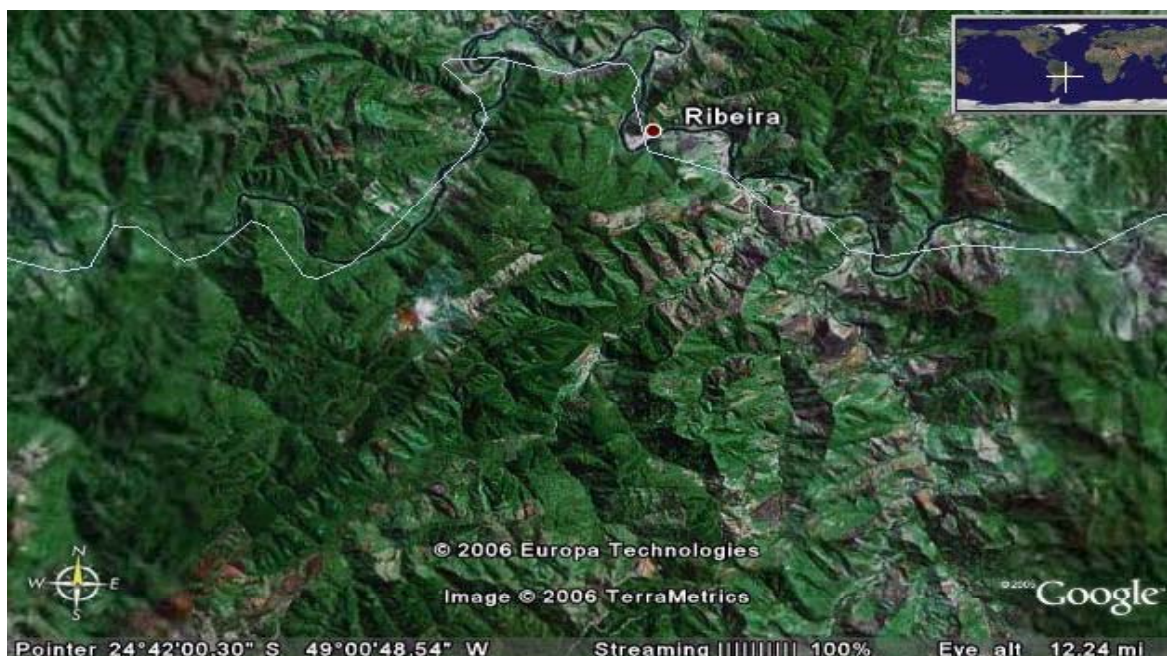


Figura 6 – Localização Geográfica da Região do Vale do Ribeira.
Fonte: <http://www.earth.google.com/>

5.1.1. Município de Adrianópolis

Município situado no Vale da Ribeira localiza-se a Sudeste do Estado e pertence à Região Metropolitana de Curitiba (Figura 7). A região de Adrianópolis apresenta-se em grande parte do seu território sobre um relevo ondulado e montanhas com grandes desníveis altimétricos. Os terrenos da região estão assentados predominantemente sobre rochas calcáreas com alto poder de dissolução, sendo comum nessas áreas a presença de dolinas, sumidouros e cavernas. Sua fonte de renda está dividida entre exploração pecuária, exploração de madeiras principalmente *Pinus* e algumas atividades iniciais voltadas ao turismo. Sua riqueza natural está no Parque Estadual das Lauráceas.

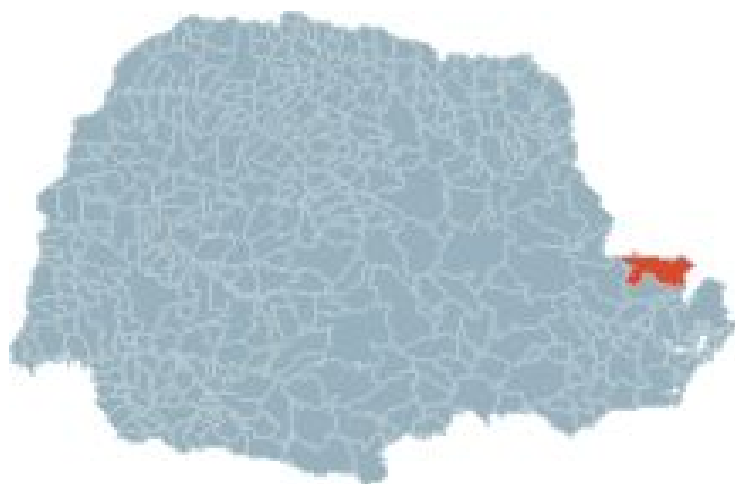


Figura 7 – Mapa do Estado do Paraná, com destaque para o município de Adrianópolis.

Fonte: www.ipardes.gov.br

Altitude: 154 m

Latitude: 24° 39' 26" S

Longitude: 48° 59' 28" O

Área: 1341,334 km²,

População urbana: 1.614 habitantes.

População rural: 5.392 habitantes.

População total: 7.006 habitantes.

5.1.2. Município de Cerro Azul

O município está situado a sudeste do Estado do Paraná e faz parte da Região Metropolitana de Curitiba (Figura 8). Cerro Azul tem uma grande importância histórica e estratégica para o Estado do Paraná pela sua Antigüidade, teve origem em 1860, o município é considerado referência para o Vale do Ribeira pela sua expressiva produção de citros, além da extração de madeira de reflorestamento e da pecuária que atualmente também ocupam lugar de destaque na economia municipal. É conhecido como a capital da laranja, pela sua tradição no cultivo de citros, tendo sido por muitos anos o maior produtor do Estado. A população de Cerro Azul é predominantemente rural.



Figura 8 – Mapa do Estado do Paraná com destaque para o município de Cerro Azul.

Fonte: www.ipardes.gov.br

Altitude: 393 m

Latitude: 24° 49' 25" S

Longitude: 49° 15' 40" O

Área: 1.341,323 km²

População urbana: 3.916 habitantes.

População rural: 12.429 habitantes.

População total: 16.345 habitantes.

5.1.3. Município de Rio Branco do Sul

Historia-se que o atual Município de Rio Branco do Sul tenha tido sua origem em um arraial formado ao longo de alguma jazida aurífera (Figura 9). Entre as riquezas naturais, cabe citar a Gruta de Lancinhas com um comprimento de 350 metros, percorridos pelo Ribeirão Lancinhas que no final do nível se transforma em cascata, possuindo inúmeras galerias sendo a maior e a mais bonita a Galeria de Cristais.



Figura 9 – Mapa do Estado do Paraná com destaque para o município de Rio Branco do Sul.

Fonte: www.ipardes.gov.br

Altitude: 892,78 m

Latitude: 25° 11' 24" S

Longitude: 49° 18' 51" O

Área: 816,712 Km²

População urbana: 20.039 habitantes.

População rural: 9.282 habitantes.

População total: 29.321 habitantes.

5.2. Coleta de dados epidemiológicos de LTA no Vale do Rio Ribeira.

Para conhecer o perfil epidemiológico da leishmaniose cutânea nesta região foi feito um levantamento de dados, através das fichas de notificação de casos clínicos da Secretaria de Estado da Saúde (Anexo1). Nestas fichas são registrados dados dos pacientes como profissão, idade, sexo, número e local de lesões, tempo e local provável da infecção, diagnóstico e tratamento.

5.3. Diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana.

Os casos clínicos de leishmaniose foram diagnosticados com o emprego do teste intradérmico de Montenegro. Este teste foi realizado com antígeno fornecido pela Secretaria de Saúde (CPPI). A quantidade de antígeno inoculado intradermicamente na face anterior do antebraço do paciente foi de 0,1 mL. Foram consideradas positivas as reações cujo diâmetro médio da pápula foi superior a seis mm, após 48 – 72 horas da inoculação. Além do teste IDRM em alguns pacientes foi feito diagnóstico parasitológico e biópsia para isolamento e identificação do parasita.

5.4. Isolamento e Cultivo de *Leishmania* obtida de lesões de pessoas e cães.

Pacientes com intradermorreação positiva foram submetidos à biópsias ou aspirados do bordo das lesões para o isolamento do protozoário. O material obtido foi inoculado em meio de cultura (NNN ou Tobbie e Evans) e repicado a cada sete dias para novos tubos.

Os isolados foram criopreservados no banco de cepas de *Leishmania* do laboratório de Parasitologia Molecular/UFPR.

Após isolamento, fez-se cultura de massa desses isolados em meio RPMI, para a obtenção de biomassa visando à extração do DNA para as etapas de PCR.

5.5. Cepas referências de *Leishmania*.

As cepas referências (Tabela III) usadas no presente trabalho seguem as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990). Foram descongeladas, repicadas semanalmente e processadas como os isolados para obtenção de biomassa para as etapas extração de DNA para as técnicas de PCR.

TABELA III – Cepas Referências de *Leishmania*.

ESPÉCIES	CÓDIGO OMS
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/00/LTB300
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	MHOM/FR/71/LRM75

5.6. Recuperação da Biomassa de *Leishmania*.

A biomassa de parasitos foi obtida a partir do conteúdo da garrafa de 100mL de cultivo celular, em meio RPMI, rica em *Leishmania* livre de contaminações. Passou-se o conteúdo da garrafa para um tubo “Falcon” de 15 mL e foi centrifugado a 10.000g/20’ a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com soro fisiológico a 0,9%. Posteriormente, foi transferido o precipitado para um tubo de 2,0 mL, previamente pesado, usando pipeta Pasteur e centrifugado a 10.000 g a 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi pesada e estocada no freezer -20°C até o momento da extração do DNA.

5.7. Extração de DNA genômico de *Leishmania* isolados de lesões de pessoas e cães.

Num tubo de 2,0 mL que continha de 50 a 100mg de biomassa de *Leishmania*, foram adicionados 400µL de Tampão de Lise (TE), pH = 8, SDS a 1% em volume final e 200µg/mL final de Rnase (20mg/mL) e foi incubado, em

banho-maria, por 2 horas à 37°C. Em seguida, foi adicionado 200µg/mL de Proteinase K (20mg/mL) e, posteriormente foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 55°C por 2 horas. Essa fase foi para a lise das células e eliminação de RNA e proteínas. Logo após, para a desproteínização das células foi feita a extração com fenol saturado e clorofórmio. Adicionou-se Fenol Saturado (fase inferior) volume/volume e centrifugou-se a 12000g por 5 minutos a 20°C. Recuperou-se o sobrenadante, com ponteiros cortadas e o sobrenadante foi passado para outro tubo, onde se fez uma segunda extração com fenol/clorofórmio/alcoolisoamílico (24:24:1). Após esse procedimento, foi adicionado clorofórmio volume/volume. Novamente as amostras foram centrifugadas (12000 x g / 5 minutos a 20°C). Recuperou-se a fase superior e fez-se uma segunda extração com Clorofórmio. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado com acetado de sódio a 3M 10% em volume final e dois volumes de etanol. Permaneceu a - 20°C por 12 horas. Posteriormente, foi feita centrifugação a 12000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado duas vezes com 300µL de etanol 70% e centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi deixado para secar por 10 minutos e, após esse tempo, o DNA foi reconstituído com 100µL de água ultra-pura.

5.7.1. Quantificação de DNA genômico de *Leishmania*

As quantificações de DNA extraído foram feitas pela medida de absorção a 260nm em espectrofotômetro (Gene Quant[®]) e em gel de agarose a 0,6%.

5.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A avaliação da PCR como método diagnóstico de material isolado de cultura com diferentes iniciadores foi realizada nas seguintes condições: DNA na concentração de 40ng foi amplificado em um termociclador (PCR Express – Hybaid) em um volume final de reação de 25µL. As variáveis analisadas foram concentrações de cloreto de magnésio, quantidade de Taq polimerase e temperatura de anelamento.

As condições de reações utilizadas para amplificação de um segmento específico das amostras de DNA na PCR, iniciadores usados e condições de amplificação estão descritos nas Tabelas IV e V. No volume final de reação foram acrescentados 25 mL de óleo mineral para evitar a evaporação.

TABELA IV – Condições de Amplificação de DNA de cepas de *Leishmania* isoladas de pessoas e de cães, usando os iniciadores b1 e b2

CARACTERISTICA	Primer b1/b2
Produto PCR (pb)	103
Reação Mix	
Tampão PCR 10 X	10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl
DNTP * (mM cada)	0,2
MgCl ₂ (mM)	1,5
Iniciador (pmol)	50
Taq polimerase (U)	0,6
CICLOS	
Desnaturação inicial	
Desnaturação	95°C por 30s
Anelamento	70°C por 90s
Extensão	72°C por 90s
Nº de ciclos	35
Extensão final	72°C por 10 min

dNTP* = deoxinucleotídeos trifosfatos

TABELA V – Condições de Amplificação para os iniciadores a1 e a2 (metodologia adaptada de MIMORI et al., 1998).

CARACTERISTICA	a1/a2
Produto PCR (pb)	62
Reação Mix	
Tampão PCR 10 X	10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl
DNTP * (mM cada)	0,2
MgCl ₂ (mM)	1,5
Iniciador (pmol)	50
Taq polimerase (U)	0,6
CICLOS	
Desnaturação inicial	95°C por 5 min
Desnaturação	95°C por 30s
Anelamento	55°C por 90s
Extensão	72°C por 90s
Nº de ciclos	35
Extensão final	72°C por 10 min

dNTP* = deoxinucleotídeos trifosfatos

5.7.3 Eletroforese

Para separar os fragmentos e avaliar a massa molecular dos produtos amplificados foi feita eletroforese em gel de agarose, de acordo com os procedimentos abaixo:

- 1 – Preparar gel de agarose 1,6%, utilizando tampão TBE 1X.
- 2 – Adicionar o gel fundido à cuba e introduzir o pente. Aguardar a solidificação e retirar o pente.
- 3 – Adicionar tampão TBE à cuba, de maneira a cobrir todo o gel.
- 4 – Aplicar as amostras (corante “*Blue Juice*” 1:10 de solução de DNA) e o padrão de massa molecular com pipeta nas cavidades, no gel.
- 5 – Realizar a corrida eletroforética a 50 V ou 100 V conforme tamanho do gel. Tempo de corrida do gel 2hs para mini gel e 4 horas para o Max gel.
- 6 – Transferir o gel para uma cuba contendo solução diluída de brometo de etídeo.

5.7.4. Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram visualizados em luz ultravioleta e registradas as bandas de DNA por fotografia em câmara de luz ultra violeta.

5.7.5. Procedimento de descontaminação

Todas as medidas de segurança foram usadas para evitar contaminações. As principais delas foram salas separadas para a realização da PCR, uso de luvas em cada fase, troca de aventais e uso de luz ultravioleta.

5.8. Coleta de Sangue de Cães

Foram coletadas amostras de sangue da veia cefálica, após contenção por meios físicos, de cães de localidades onde ocorreram casos de leishmaniose humana nos anos de 2004 e 2005. Foram anotados dados referentes ao sexo do animal, presença de lesões características no animal, resença de alguma pessoa na residência que apresentasse leishmaniose.

5.9. Ensaio Imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato ortofenilenodiamino (OPD). Para que haja manifestação da cor, é necessário que ocorra uma série de eventos em seqüência. Estes eventos têm início com a sensibilização da placa com o antígeno e seguem até a aferição da cor pelo leitor de ELISA.

5.9.1. Sensibilização da Placa

Sensibilização é processo de fixação, neste caso, do antígeno na placa. A quantidade de antígeno por cavidade foi baseada na concentração protéica de antígeno utilizado. O antígeno em questão foi utilizado em três concentrações buscando-se estabelecer a melhor. Inicialmente utilizou-se a concentração de 500 ng/cavidade, 300 ng/cavidade e posteriormente a de 150 ng/cavidade. Conforme a concentração protéica diluiu-se o antígeno em solução tampão de ligação. Com a utilização de pipetas fez-se a distribuição da solução antigênica na placa. Foram colocados 100µl da solução de antígeno por cavidade, exceto na primeira coluna. A placa sensibilizada foi armazenada na geladeira por 12 horas. Nesta, e nas etapas seguintes, a placa foi protegida durante o período de incubação por uma tampa plástica.

5.9.2. Primeira Lavagem

Esta tem a finalidade de remover o antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se a solução de lavagem (0,05% *Tween* salina). As cavidades foram completamente preenchidas com a solução de lavagem. Na seqüência, remove-se o conteúdo. Esta operação foi realizada duas vezes.

5.9.3. Bloqueio da Placa

A placa foi bloqueada com 100 µl de solução de bloqueio (caseína 2%) por poço. Incubou-se a placa em estufa a 37°C por 60 minutos. O bloqueio tem a finalidade de ocupar espaços deixados nas cavidades da placa no processo de sensibilização.

5.9.4. Segunda Lavagem

A finalidade desta lavagem foi para remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram na placa. A operação foi realizada duas vezes.

5.9.5. Diluição dos Soros

Os soros foram diluídos em solução tampão de incubação. Foram realizadas duas diluições para estabelecer a melhor concentração. Inicialmente utilizou-se a diluição de 1:100 e posteriormente a de 1:200. Em cada cavidade foi colocado 100 µl de soro diluído. Na primeira coluna da placa não foram colocadas amostras de soro. Depois da distribuição das amostras de soro na placa, a mesma foi incubada em estufa a 37°C por 60 minutos. A finalidade desta etapa é fazer a ligação do antígeno, fixado na placa, com anticorpos específicos presentes no soro de cães com Leishmaniose.

5.9.6. Terceira Lavagem

Esta lavagem destinou-se a remover anticorpos que não estão ligados aos antígenos fixados na placa, bem como outras substâncias presentes no soro. Esta lavagem é mais rigorosa que as anteriores, pois se permanecer pequenos resíduos nas cavidades, o resultado poderá se alterar significativamente. Por isso, este processo é repetido seis vezes.

5.9.7. Diluição do Conjugado

De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em solução tampão de incubação. Foram utilizadas duas diluições do conjugado 1:1000 e 1:2000. Foram distribuídos 100 µl de conjugado diluído em cada cavidade, exceto na primeira coluna da placa. Depois da distribuição do conjugado na placa, a mesma foi incubada em estufa a 37°C por 60 minutos.

5.9.8. Quarta Lavagem

Esta lavagem tem a finalidade de remover todo o conjugado que não estiver ligado a moléculas de anticorpos nas cavidades da placa. Qualquer

resíduo do conjugado alterará completamente os valores da reação. Este procedimento foi repetido 6 vezes.

5.9.9. Substrato.

A atividade enzimática foi revelada utilizando-se como cromógeno a solução de ortofenilenodiamino (OPD). O OPD é a substância na qual a enzima peroxidase vai atuar, resultando na formação da cor. Utilizou-se H_2O_2 como catalisador e tampão citrato pH 5,0 como veículo. Em cada cavidade foram colocados 100 μl da solução contendo 20 μg de OPD. Para o preparo da solução pipetou-se 10 ml de tampão citrato e adicionou-se uma pastilha de OPD (2g) e 2 μl de H_2O_2 . Distribuíram-se 100 μl de solução por cavidade. A seguir, a placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

5.9.10. Parada da Reação

Para manter uniformidade de tempo de reatividade enzima-substrato, após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida através da adição de 20 μl de H_2SO_4 a 5 % em todas as cavidades da placa. A partir desse momento, a enzima peroxidase deixa de atuar sobre o substrato. Procedeu-se a leitura.

5.9.11. Leitura

As leituras das microplacas foram realizadas em 492 nm, por um leitor de ELISA TITERTEK multiscan MCC/340P versão 2.20. O leitor foi ligado 10 minutos antes da leitura para que o aparelho faça autocalibração.

5.9.12. Nível de Corte entre positivos e negativos – *Cut-off* do Ensaio Imunoenzimático ELISA.

Os valores de densidade óptica (D.O.) do ensaio imunoenzimático nos cães provenientes da região estudada variou entre 0,187 a 0,445. Os valores foram calculados pela média dos valores de absorbância mais dois desvios padrões. Valor de *cut-off* = 0,178.

6. RESULTADOS

Num primeiro tempo foram analisados os casos humanos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) dos municípios de Cerro Azul, Adrianópolis e Rio Branco do Sul localizados na região do Vale do Rio Ribeira, nos anos de 2001 a 2006.

6.1. Município de Adrianópolis

No município de Adrianópolis foram assinalados 56 casos de LTA em humanos, no período de janeiro de 2001 até maio de 2006. Neste período, o maior índice registrado foi em 2003 (18 casos). Para o ano de 2006 até o mês de maio, foram notificados 13 casos. Na tabela VI é dada a distribuição da LTA em pacientes por faixa etária. Indivíduos na faixa de 31 a 40 anos registrou um total de 14 casos (25%) (Figura 10).

TABELA VI - Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Adrianópolis, no período 2001 –2006.

ANO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
0 – 10 anos	1	2	3	0	0	2	8
11 – 20 anos	1	0	5	2	0	2	10
21 – 30 anos	1	2	2	0	1	2	8
31 – 40 anos	0	3	4	5	0	2	14
41 – 50 anos	0	0	1	3	0	1	5
51 – 60 anos	1	0	2	0	1	2	6
61 – 70 anos	0	0	1	1	0	2	4
71 – 80 anos	1	0	0	0	0	0	1
TOTAL	5	7	18	11	2	13	56

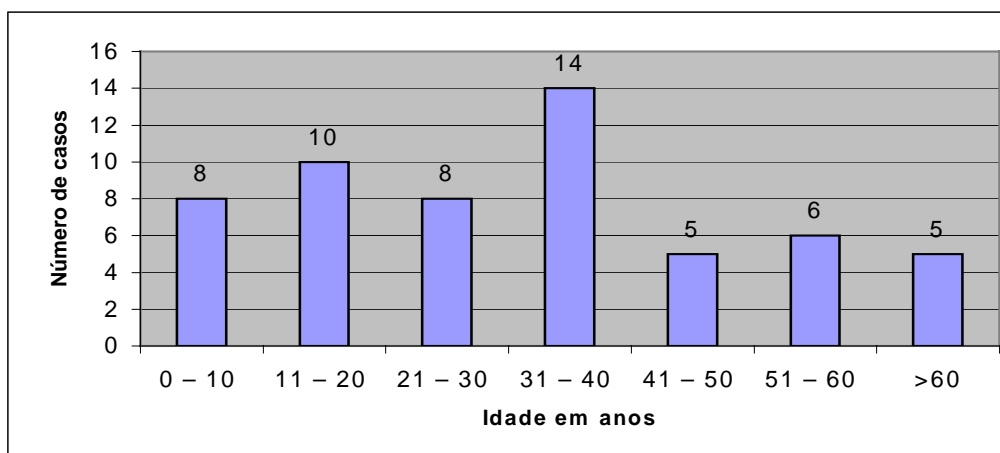


Figura 10 - Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Adrianópolis, no período 2001 – 2006.

De acordo com o sexo foram registrados 20 casos em mulheres, e 36 casos em homens no período de 2001 a 2006 (Tabela VII e Figura 11).

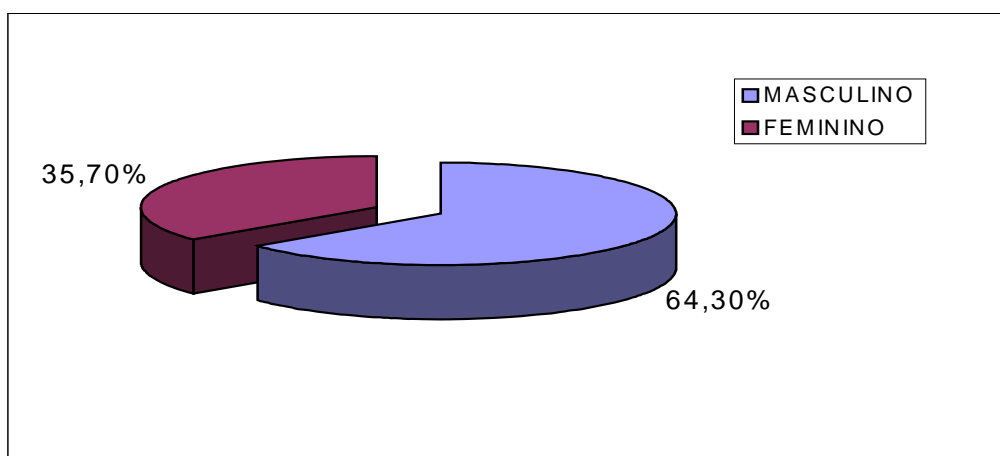


Figura 11 – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, segundo o sexo dos pacientes, no município de Adrianópolis, em percentagem, período 2001 – 2006.

TABELA VII – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, de acordo com o sexo, no município de Adrianópolis, no período 2001 – 2006.

SEXO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
MASCULINO	3	3	14	7	1	8	36
FEMININO	2	4	4	4	1	5	20
TOTAL	5	7	18	11	2	13	56

Os casos de LTA foram notificados em vinte localidades do município com distribuição bastante homogênea, com um, dois e três casos nas diversas localidades. A localidade do Ribeirão do Rocha foi a que registrou maior número com 9 casos, e a localidade Perau registrou 7 casos sendo 5 no ano de 2006 (Tabela VIII e Anexo 2).

TABELA VIII – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por localidades, no município de Adrianópolis, no período 2001 – 2006.

LOCALIDADE	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Barra Grande	1	0	0	1	0	0	2
Barra Linda	0	0	0	0	0	3	3
BR 476, KM-04	0	0	0	1	0	1	2
Capelinha	0	0	1	0	0	0	1
Carumbé	0	0	1	0	1	0	2
Descampado	0	1	0	0	0	0	1
Epitáceo Pessoa	2	0	0	1	0	3	6
Ilha Rasa	0	0	0	0	1	0	1
João Sura	1	0	3	0	0	0	4
Laranjal	0	0	1	0	0	0	1
Mamonas	0	0	1	0	0	0	1
Perau	0	0	2	0	0	5	7
Colônia	0	0	1	1	0	0	2
Porto Velho	0	0	1	0	0	0	1
Praia do Peixe	0	1	1	1	0	0	3
Ribeirão do Rocha	1	3	4	1	0	0	9
Sitinho	0	0	0	1	0	0	1
Sede	0	1	0	2	0	0	3
Tatupeva	0	1	1	0	0	1	3
Vila Mota	0	0	1	2	0	0	3
TOTAL	5	7	18	11	2	13	56

6.2. Município de Cerro Azul

Foram registrados 191 casos humanos de LTA no Município de Cerro Azul, sendo que no ano de 2003 houve maior número de casos com 90 casos (47,12%).

No ano de 2004 a faixa etária entre 21-30 anos apresentou maior número de casos (6), em 2005 e 2006 essa faixa etária foi também mais prevalente (Tabela IX e Figura 12).

TABELA IX – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006.

FAIXA ETÁRIA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
0 – 10 anos	3	9	20	5	4	2	43
11 – 20 anos	3	8	18	5	3	1	38
21 – 30 anos	1	5	17	6	3	2	34
31 – 40 anos	1	6	17	5	1	2	32
41 – 50 anos	3	4	8	3	2	1	21
51 – 60 anos	0	1	4	4	1	0	10
61 – 70 anos	0	2	5	3	0	0	10
71 – 80 anos	0	0	1	0	1	0	2
81 – 90 anos	0	0	0	1	0	0	1
TOTAL	11	35	90	32	15	8	191

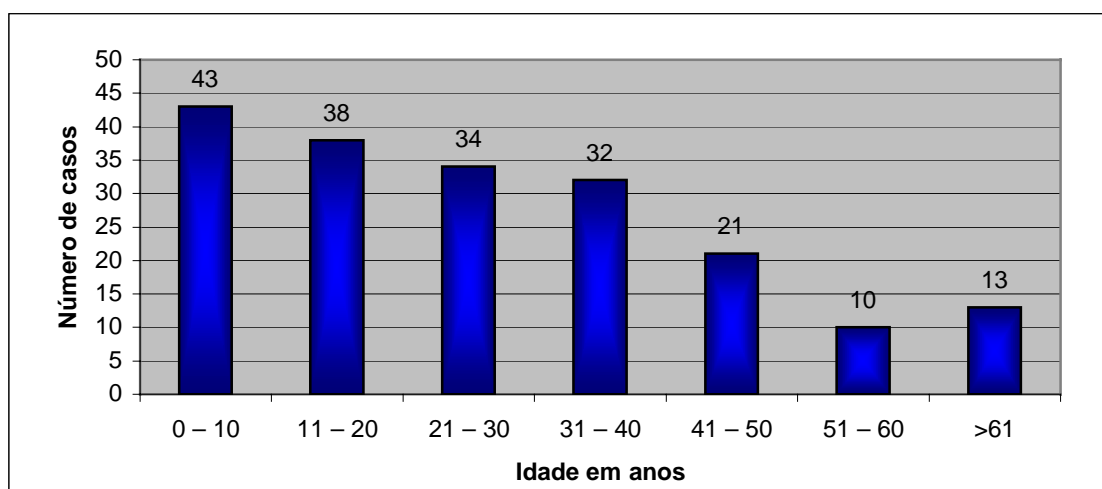


Figura 12 - Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006.

Com relação à distribuição dos casos por sexo, foi observada diferença na ocorrência de LTA entre o sexo masculino e o feminino, sendo que para o sexo masculino houve registro de maior número de casos em 2002, 2003 e 2004 e para o sexo feminino em 2001, 2005 e em 2006 (Tabela X e Figura 13).

TABELA X – Distribuição dos casos de LTA, de acordo com o sexo, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006.

SEXO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Masculino	3	18	54	17	7	3	102
Feminino	8	17	36	15	8	5	89
TOTAL	11	35	90	32	15	8	191

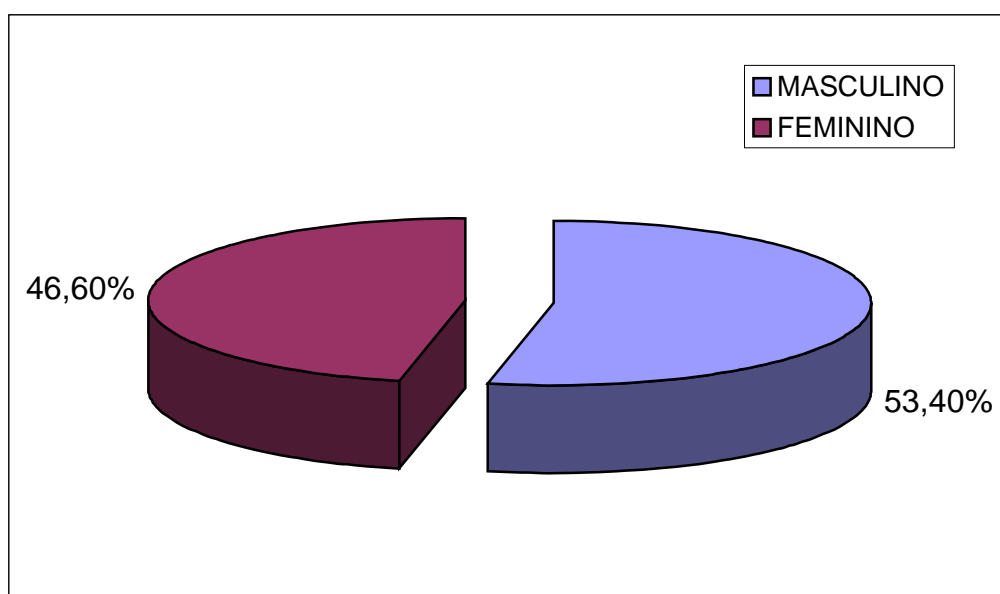


Figura 13 - Distribuição dos casos de LTA, segundo o sexo dos pacientes, no município de Cerro Azul, em percentagem, no período 2001 – 2006.

As localidades onde foram notificados os maiores números de casos de LTA no município de Cerro Azul foram Três Barras e Barra Bonita, com 15 e 13 casos respectivamente, seguido de Ribeirão do Scheffer com 12 casos (Tabela XI e anexo 3).

TABELA XI – Distribuição dos casos de LTA, por localidades, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006.

LOCALIDADE	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Areia da Piedade	2	5	1	0	0	0	8
Barra Bonita	0	0	10	2	1	0	13
Barra Bonita dos Santos	3	0	0	0	0	0	3
Barra das Estrelas	0	1	1	1	0	0	3
Barra do Rio P. Grossa	0	1	0	0	1	0	2
Barra do Teixeira	0	0	7	2	2	0	11
Barra do Tigre	1	4	0	0	0	2	7
Barra Jaguatirica	0	1	0	0	0	0	1
Barreiro do Turvo	1	0	0	0	0	0	1
Balsa Velha	0	0	0	0	1	0	1
Bicas de Pedra	0	0	1	0	0	0	1
Boi Perdido	0	0	0	2	0	0	2
Bomba	1	0	1	1	0	0	3
Bom Sucesso	0	1	0	0	0	0	1
Cabeceira do Rib. Veado	0	0	2	0	0	0	2
Estrada da Ribeira	0	0	1	0	0	0	1
Freguesia	0	0	1	0	0	0	1
Guaraípos	0	0	4	1	0	0	5
Jaguatirica	0	0	2	1	0	0	3
Lageado Grande	0	1	1	1	1	0	4
Mato Preto	0	1	6	2	1	0	10
Margem Esq. R P Grossa	0	1	0	0	0	0	1
Morro Grande	0	1	0	0	0	0	1
Pedra Lousa	0	3	3	1	0	0	7
Pinhal Grande	0	0	0	1	0	0	1
Pinta	0	0	1	0	0	0	1

TABELA XI – Distribuição dos casos de LTA, por localidades, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006. (continuação).

LOCALIDADE	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Quarteirão da Canha	0	0	0	1	0	0	1
Quarteirão do Silvério	0	1	0	0	0	0	1
Quarteirão dos Órfãos	0	1	3	1	0	0	5
Quebrada funda	0	0	2	0	0	0	2
Ribeirão Bonito Turvo 2	0	0	1	0	0	0	1
Ribeirão B. das Flores	0	0	6	0	0	0	6
Ribeirão B. do Chapéu	0	1	0	2	4	0	7
Ribeirão do João Gordo	0	1	0	0	0	0	1
Ribeirão do Tigre	0	2	0	0	1	0	3
Ribeirão do Scheffer	0	1	3	5	3	0	12
Rocha	0	0	1	0	0	0	1
Rua Athanagildo	0	0	3	0	0	0	3
Rua Benjamin Constant	0	0	0	0	0	1	1
Rua Carlos Gomes	0	0	0	0	0	1	1
Rua da Raia	0	0	0	1	0	0	1
Rua Mal. D. Fonseca	1	0	3	0	0	0	4
Rua Mal. F. Peixoto	0	0	0	1	0	0	1
Rua São Jorge	0	1	1	0	0	0	2
Santa Bárbara	2	0	0	0	0	0	2
São Sebastião	0	2	0	3	0	0	5
Sete Quedas	0	1	2	1	0	0	4
Serra	0	0	6	0	0	0	6
Taquara	0	0	1	0	0	0	1
Três Barras	0	1	8	2	0	4	15
Turvo	0	1	2	0	0	0	3
Vila Bestel	0	1	3	0	0	0	4

TABELA XI – Distribuição dos casos de LTA, por localidades, no município de Cerro Azul, no período 2001 – 2006. (continuação).

LOCALIDADE	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Vila Depétris	0	0	1	0	0	0	1
Vila Eliane	0	0	1	0	0	0	1
Vila Mangger	0	0	1	0	0	0	1
Vila Scheleider	0	1	0	0	0	0	1
TOTAL	11	35	90	32	15	8	191

6.3. Município de Rio Branco do Sul

Foram registrados 39 casos de leishmaniose de janeiro de 2001 a maio de 2006, no Município de Rio Branco do Sul, sendo que a faixa etária de 0 a 10 anos foi a que mais apresentou números de casos, com 10 casos neste período (Tabela XII e Figura 14).

TABELA XII – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 – 2006.

FAIXA ETÁRIA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
0 – 10 anos	3	5	0	1	1	0	10
11 – 20 anos	0	4	1	0	1	0	6
21 – 30 anos	3	3	1	0	0	0	7
31 – 40 anos	2	0	2	1	1	0	6
41 – 50 anos	2	0	0	1	0	0	3
51 – 60 anos	0	0	1	0	0	0	1
61 – 70 anos	1	1	1	0	0	0	3
71 – 80 anos	0	0	1	0	0	1	2
81 – 90 anos	0	0	1	0	0	0	1
TOTAL	11	13	8	3	3	1	39

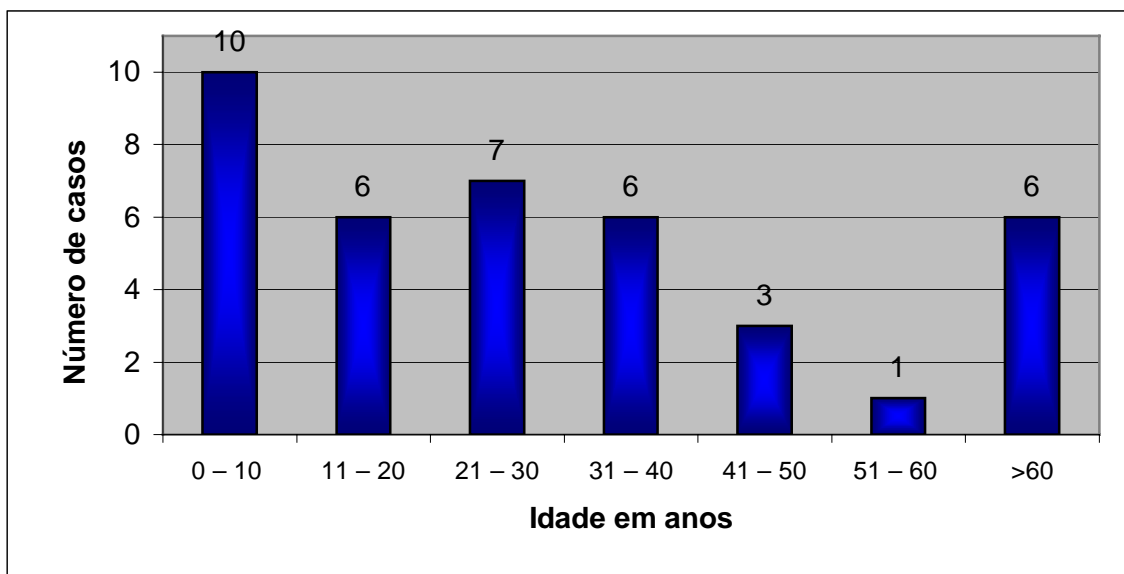


Figura 14 - Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por faixa etária, no município de Rio Branco do Sul, no período 2001 – 2006.

Com relação à distribuição dos casos de LTA de acordo com o sexo, ao contrário do que aconteceu para os demais municípios, em Rio Branco do Sul, o número de casos de LTA em mulheres foi superior ao registrado em homens, sendo que 21 casos (53,9%) foram encontrados em mulheres no período de 2001 a 2006, contra 18 casos em homens (Tabela XIII e Figura 15).

No município de Rio Branco do Sul, os casos de LTA foram notificados nas diferentes localidades, sendo que a localidade que mais apresentou casos foi a localidade do Açungui, totalizando nove casos no período estudado (Tabela XIV e Anexo 4).

TABELA XIII – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, de acordo com o sexo, em Rio Branco do Sul, no período 2001 – 2006.

SEXO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Masculino	6	8	3	1	0	0	18
Feminino	5	5	5	2	3	1	21
TOTAL	11	13	8	3	3	1	39

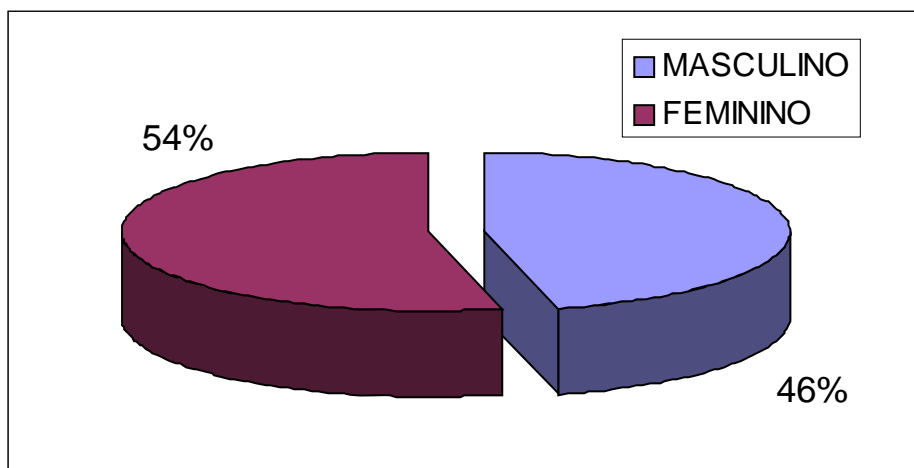


Figura 15 - Distribuição dos casos de LTA segundo o sexo dos pacientes, em Rio Branco do Sul, em percentagem, no período 2001 – 2006.

TABELA XIV – Distribuição dos casos de LTA em pacientes humanos, por localidades, em Rio Branco do Sul, no período 2001 – 2006.

LOCALIDADE	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Açungui	4	2	0	1	2	0	9
Areias do Rosário	0	0	1	0	0	0	1
Barra Florestal	0	1	0	0	0	0	1
Centro Alto	0	0	1	0	0	0	1
Corriolinha	3	1	1	0	0	0	5
Encantilado	1	3	0	0	0	0	4
Florestal	0	1	0	0	0	0	1
Itaú	0	0	1	0	0	0	1
Itaretama	0	1	0	0	0	0	1
Jacaré	1	0	0	0	0	0	1
N.S. de Fátima	1	0	0	0	0	0	1
Piedade	0	1	0	0	0	0	1
Pinhal	0	0	0	0	1	0	1
Ribeira Dois Irmãos	0	1	0	2	0	0	3
Ribeirinha	1	0	1	0	0	0	2
Santa Terezinha	0	0	0	0	0	1	1
São Vicente	0	2	0	0	0	0	2
São Pedro	0	0	1	0	0	0	1
Sede	0	0	1	0	0	0	1
Tigre	0	0	1	0	0	0	1
TOTAL	11	13	8	3	3	1	39

6.4. Cepas isoladas de humanos e de cães portadores de lesões cutâneas

Na tabela XV são dados o código de identificação da cepa, localidade e hospedeiros dos isolados que foram identificados no presente trabalho.

TABELA XV – Lista de isolados obtidos de pacientes humanos e de cães com lesões compatíveis para LTA de Adrianópolis, Cerro Azul e Rio Branco do Sul.

CÓDIGO OMS	LOCALIDADE/ MUNICÍPIO	HOSPEDEIRO
MCAN/BR/04/CUR292	LARANJAL /ADRIANÓPOLIS	CÃO
MHOM/BR/99/CUR125	R. DO ROCHA /ADRIANÓPOLIS	HUMANO
MHOM/BR/99/CUR126	R. DO ROCHA /ADRIANÓPOLIS	HUMANO
MHOM/BR/00/CUR156	ANTUNES/RIBEIRA	HUMANO
MHOM/BR/00/CUR157	CERRO AZUL	HUMANO
MHOM/BR/01/CUR158	RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/01/CUR159	RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/01/CUR160	CERRO AZUL	HUMANO
MHOM/BR/02/CUR192	AÇUNGUI/RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/02/CUR194	AÇUNGUI/RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/02/CUR195	AÇUNGUI/RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/02/CUR196	AÇUNGUI/RIO BRANCO DO SUL	HUMANO
MHOM/BR/03/CUR250	CERRO AZUL	HUMANO
MHOM/BR/04/CUR315	AÇUNGUI/RIO BRANCO DO SUL	HUMANO

6.5. Identificação das cepas de *Leishmania* isoladas usando a técnica de PCR

INICIADOR b1/b2

Os iniciadores b1/b2 foram desenhados para distinguir a espécie específica *L. braziliensis* das outras quatro espécies que causam a leishmaniose cutânea no Novo Mundo *L. (V.) panamensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (L.) mexicana*

e *L. (L.) amazonensis*. Eles são polimórficos e específicos. Estes iniciadores espécie-específico foram desenhados com base nas seqüências obtidas dos produtos de RAPD segundo MIMORI et al., 1998. Os produtos da amplificação do DNA das cepas isoladas de humanos e de cão resultaram num fragmento de 103 pb. Os resultados estão exemplificados na figura 16.

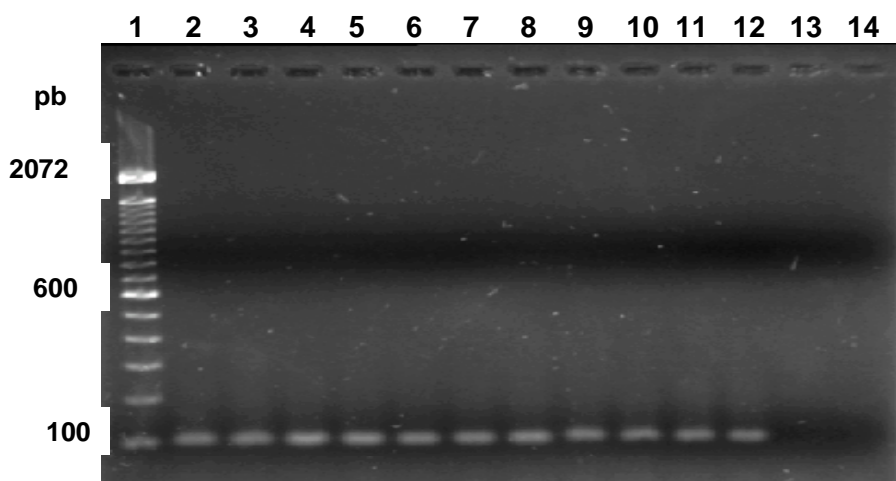


Figura 16 - Produtos de amplificação de DNA de cepas de *Leishmania* pela Técnica de PCR usando o par de nucleotídeos iniciadores b1(forward)/b2(reverse) proposto por MIMORI et al., (1998). Linha 1: Marcador de peso Molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen); Linha 2: Cur 292; Linha 3: Cur 125; Linha 4: Cur 126; Linha 5: Cur 156; Linha 6: Cur 157; Linha 7: Cur 158; Linha 8: Cur 159; Linha 9: Cur 315; Linha 10: Cur 192; Linha 11: Cur 250; Linha 12: referência *L.(V.) braziliensis*; Linha 13: referência *L.(L.) infantum* ; Linha 14: referência *L.(L.)amazonensis*.

INICIADOR a1/a2

As cepas isoladas também foram submetidas a iniciadores específicos para *L.(L.) amazonensis*, usando os iniciadores a1 e a2 e as condições de amplificação segundo MIMORI et al., (1998) com algumas modificações. Os resultados obtidos mostram que o produto amplificado apresentava 62 pares de base (Figura 17) e verificou-se ausência de bandas para *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) infantum*. Por essa razão, a combinação desses iniciadores com os b1/b2 e a1/a2 permite um diagnóstico direto e rápido para a detecção desta espécie.

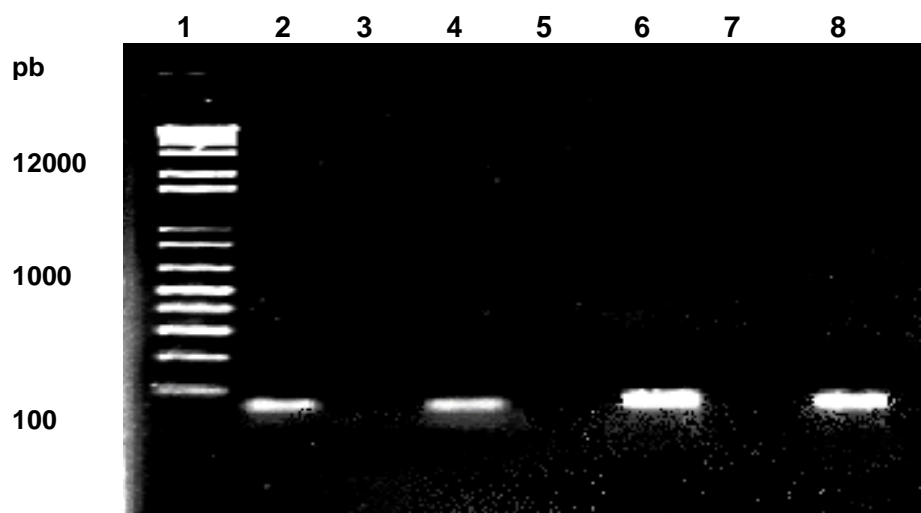


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1,6% dos produtos da PCR das cepas de *Leishmania* usando os iniciadores a1 e a2. Linha 1: Marcador de peso Molecular 1Kb; Linha 2: referência *L. (L.) amazonensis*; Linha 3: Cur 196; Linha 4: Cur 210; Linha 5: referência *L. (V.) braziliensis*; Linha 6: referência *L. (L.) amazonensis*; Linha 7: 194; Linha 8: Cur 41.

Todas as cepas do protozoário isoladas de lesões cutâneas, tanto de humanos quanto de cães, foram submetidas ao PCR com os dois conjuntos de iniciadores (b1/b2 e a1/a2). Nenhum produto de PCR foi obtido com os iniciadores a1/a2. Somente a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* apresentou banda com 62 pares de base, após eletroforese. Para os iniciadores b1/b2 todas cepas, isoladas em humanos e de cão, apresentaram produto de eletroforese com 103 pares de base, indicando tratar-se, portanto, de *L. (V.) braziliensis*.

6.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ensaio imunoenzimático foi padronizado com concentração protéica de 6 mg/mL do antígeno com 250 ng/cavidade. As diluições do conjugado e dos soros ficaram estabelecidas com 1:1000 e 1:100, respectivamente. Foram considerados positivos os soros de cães quando os valores de absorbância (D.O.) foram superiores a 0,178 (*cut-off*).

Foram colhidos sangues de 299 cães dos municípios de Adrianópolis, Rio Branco do Sul e Cerro Azul com 175, 89 e 35 cães, respectivamente. Os soros foram submetidos ao ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania*. No total 45 (15,05%) cães apresentaram-se sororeagentes (tabela XVI e Figura 18).

Foi realizado o Teste Qui Quadrado para avaliar se havia diferença na amostragem colhida. Em nível de significância 0,05% a distribuição mostrou-se homogênea (Anexo 5).

TABELA XVI – Detecção de anticorpos contra *Leishmania* pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães dos Municípios do Vale do Ribeira.

MUNICÍPIO	NÃO REAGENTES	%	REAGENTES	%	TOTAL
Adrianópolis	150	85,714	25	14,286	175
Rio Bco do Sul	74	83,146	15	16,854	89
Cerro Azul	30	85,714	5	14,286	35
TOTAL	254	84,95	45	15,05	299

6.6.1. Município de Adrianópolis

Os soros de 175 cães coletados no Município de Adrianópolis foram submetidos ao ensaio imunoenzimático (ELISA) e 25 apresentaram-se soro reagentes. Isto representa 14,28% dos cães deste Município e 8,36% no total de cães estudados nos três municípios da região do Vale do Ribeira (Tabela XVI).

As localidades de Capelinha, Barra Linda e Laranjal foram encontrados maior número de cães soro reagentes das onze localidades estudadas (Tabela XVII).

Os valores de absorbância encontrados nos cães soro reagentes variaram de 0,187 a 0,445 (valor de *cut-off* = 0,178).

TABELA XVII – Detecção de anticorpos contra *Leishmania* pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do Município de Adrianópolis.

LOCALIDADE	NÃO REAGENTES	%	REAGENTES	%	TOTAL
Laranjal	2	40	3	60	5
Vila Bela	20	100	0	0	20
Barra Linda	8	57,143	6	42,857	14
Vila Mota	7	100	0	0	7
Barra Grande	12	100	0	0	12
Pinhalzinho	11	100	0	0	11
Carumbé	9	90	1	10	10
Capelinha	48	77,419	14	22,581	62
Colônia Sete Barras	13	92,857	1	7,143	14
Ribeirão do Rocha	9	100	0	0	9
Perau	11	100	0	0	11
TOTAL	150	85,714	25	14,286	175

6.6.2. Município de Cerro Azul

No município de Cerro Azul foram estudados 35 cães das localidades de Rio Ponta Grossa, Ribeirão Bonito do Chapéu e Barra Bonita. Cinco (14,28%) cães foram soro reagentes pelo ensaio imunoenzimático, dos quais quatro eram da localidade de Ribeirão Bonito do Chapéu (Tabela XVIII). Os valores de absorbância encontrados variaram de 0,182 a 0,464.

TABELA XVIII - Detecção de anticorpos contra *Leishmania* pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do município de Cerro Azul.

LOCALIDADE	NÃO REAGENTES	%	REAGENTES	%	TOTAL
Rio Ponta Grossa	12	92,308	1	7,692	13
Ribeirão B. do Chapéu	10	71,429	4	28,571	14
Barra Bonita	8	100	0	0	8
TOTAL	30	85,714	5	14,286	35

6.6.3. Município de Rio Branco do Sul

No município de Rio Branco do Sul foram estudados 89 cães de cinco localidades, sendo que as localidades que apresentaram cães sororeagentes foram o Açungui, Alto Açungui e Papanduva (Tabela XIX). As localidades de Açungui e Alto Açungui, com seis e oito (8,98%) cães soro reagentes são consideradas áreas circunvizinhas e localizam-se na região norte do município, próximas ao Rio Açungui.

TABELA XIX – Detecção de anticorpos contra *Leishmania* pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em soros de cães do município de Rio Branco do Sul.

LOCALIDADE	NÃO REAGENTES	%	REAGENTES	%	TOTAL
Tigre	26	100	0	0	26
Açungui	5	45,455	6	54,545	11
Alto Açungui	18	69,231	8	30,769	26
Papanduva	11	91,667	1	8,333	12
Jacaré	14	100	0	0	14
TOTAL	74	83,146	15	16,854	89

7. DISCUSSÃO

A pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* em cães foi realizada em localidades onde foram assinalados casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana, tentando correlacionar o papel do cão na manutenção do parasito na região. Para o município de Adrianópolis, observou-se que em três áreas distintas há ocorrência de cães soro reagentes no ensaio imunoenzimático (ELISA). Estas três regiões são distantes entre si, sendo que a Colônia Sete Barras faz divisa com município de Itaoca, Estado de São Paulo. Já as localidades de Barra Linda e Laranjal estão na região oeste do município. Enquanto que a localidade do Carumbé está na região central do município (Anexo 2). Nestas localidades foram encontrados cães sem sinais clínicos para Leishmaniose, mas com sorologia positiva.

Analizando os casos humanos, no período da realização dos exames nos cães, constatou-se o registro de apenas um caso humano na localidade da Colônia em 2004, um caso em Carumbé em 2005, um caso no Ribeirão do Rocha em 2004. Nas demais localidades onde ocorreram casos humanos como Vila Mota e Barra Grande não foram registrados cães com sorologia positiva.

FALQUETO et al. 1996 levantam a hipótese de correlação entre a presença de cães infectados e novos casos humanos da doença e propuseram que o parasito estivesse sendo mantido pelos cães domésticos. As observações de OLIVEIRA-NETO et al., 1988 preconizam que os casos caninos de LTA antecedem a ocorrência de casos humanos.

Em nosso estudo foi possível observar que na localidade Barra Linda de 14 animais examinados, 42,8% foram soro reagentes e no ano de 2006 houve o relato de três casos de LTA humana. Porém, em 2006 na localidade Perau, onde foram registrados cinco casos de LTA em humanos, não houve sorologia positiva para os cães da região. Pela análise desses dados não foi possível estabelecer uma correlação da leishmaniose humana e canina nesta região.

Para o município de Cerro Azul na localidade Barra Bonita não foi encontrado cão soro reagente e houve o relato de casos humanos em 2004 e 2005. Já para as localidades de Ribeirão Bonito do Chapéu de 14 cães estudados 28,5% foram soro reagentes e houve o registro de casos humanos nos dois anos.

Na localidade de Barra do Rio Ponta Grossa de 13 cães analisados apenas um mostrou-se soro reagente. Para os casos humanos temos o registro de apenas um caso em 2005 (Anexo 3). Nestas localidades não foi registrado nenhum caso de LTA humana para 2006.

Para o município de Rio Branco do Sul, a localidade do Açungui, registrou casos humanos em 2004 e 2005 sendo que os resultados de sorologia em cães da região mostraram índices de 37,83% de animais soro reagentes (para as localidades de Açungui e Alto Açungui) (Anexo 4). A análise dos casos humanos na localidade do Açungui e o índice de cães soro reagentes sugerem que tanto humanos como cães estão sujeitos aos mesmos riscos de infecção por *Leishmania (V.) braziliensis*.

Apenas um animal no município de Adrianópolis, na localidade do Laranjal apresentou sinal clínico compatível com leishmaniose (Figura 18) e submetido ao isolamento e identificação da cepa mostrou tratar-se de *L. (V.) braziliensis*. Este é a primeira comprovação da espécie parasitando cães no Vale da Ribeira. Interessante ressaltar que o animal apresentava lesões cutâneas e lesões de mucosa. A primeira identificação da espécie de *Leishmania*, na região de Adrianópolis, foi feita por Castro et al., 2001 que isolaram e caracterizaram por biologia molecular, cepas do protozoário de LTA em humanos, tratando-se também de *L. (V.) braziliensis*.

A espécie *L. (V.) braziliensis* ocorre desde o sul do México até o Norte da Argentina. No Brasil, na Amazônia esta espécie ocorre no baixo Amazonas (LAINSON et. al., 1994). No Nordeste ela ocorre no Ceará, Pernambuco e Bahia (VASCONCELOS et al., 1994, BARRAL et al., 1991). Na região sudeste, no Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo e Minas Gerais apresentam regiões endêmicas de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* (OLIVEIRA-NETO et al., 1988, FALQUETO et al., 1986, YOSHIDA et al., 1990, PASSOS et al., 1996). Na região Sul, estudos têm sido feitos principalmente no Paraná e Santa Catarina (SILVEIRA et al., 1999, BUSATO et al., 2000, CASTRO et al., 2002, 2005, THOMAZ-SOCCOL et al., 2003).

Para a região do Vale do Ribeira, nos municípios estudados, os resultados mostram que a LTA humana e canina ocorre independentemente, o que já foi relatado em outras áreas endêmicas (SILVEIRA et al., 1999, BUSATO et al.,

2000, CASTRO et al., 2005). A presença de cães com sorologia positiva mostra que o parasita está circulando nas áreas de estudo. Mas, pelas diferentes situações observadas neste trabalho não foi evidenciado fator que associem ao cão uma possível manutenção do parasito, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos e conseqüente transmissão para humanos.

Na região de Adrianópolis observa-se registro de Leishmaniose desde 1955. Porém, para os demais municípios do Vale da Ribeira os casos de LTA começaram a ser registrados a partir de 2000. Esta ocorrência foi provavelmente devido a modificações ambientais causadas pelo desmatamento para a passagem do gasoduto Bolívia-Brasil, construído anos anteriores (CASTRO et al., 2005).

O Vale da Ribeira vem sofrendo intensa ação de desmatamento em virtude da exploração da madeira modificando o ambiente natural favorecendo o contato de humanos e cães com os flebotomíneos, aumentando o risco de adquirir leishmaniose.



Figura 18 – Cão com lesões de mucosa nasal causada por *L. (V.) braziliensis*.
Foto: Marlene Dunaiski, em 21.10.2004

8. CONCLUSÕES

Para estudar a LTA na região do Vale do Rio Ribeira, no Paraná foram analisados 56 pacientes em Adrianópolis, 191 pacientes em Cerro Azul e 39 pacientes em Rio Branco do Sul no período de janeiro de 2001 a maio de 2006. Estes dados permitem concluir que:

- No município de Adrianópolis os indivíduos na faixa etária de 11 a 20 e os indivíduos de 31 a 40 anos representam a maioria dos casos notificados. Em Cerro Azul os indivíduos de 0 a 20 anos possuem o maior número de casos notificados e em Rio Branco do Sul a faixa etária predominante é de 0 a 10 anos.
- Os indivíduos do sexo masculino representam 54,28% dos casos em Adrianópolis, em Cerro Azul representam 53,64% e em Rio Branco do Sul estes indivíduos representam 46,15% do total dos casos de LTA.
- As localidades onde ocorreram casos de LTA humana em sua maioria são próximas de rios. Nos municípios de Adrianópolis e Cerro Azul os casos estão localizados próximos ao rio Ribeira e em Rio Branco do Sul ao rio Açungui.
- A espécie de *Leishmania* isolada de pacientes foi *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- Este é o primeiro trabalho epidemiológico que comprova a existência de LTA nos municípios de Cerro Azul e Rio Branco do Sul.

Para conhecer o percentual de cães soro reagentes 299 animais foram submetidos à pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e concluiu-se que:

- Em Adrianópolis o percentual de animais sororeagentes foi de 14,28%, em Cerro Azul foi 14,28% e em Rio Branco do Sul foi 16,85% .
- Na localidade do Laranjal, no Município de Adrianópolis foi encontrado um cão com Leishmaniose cutâneo mucosa e o parasita isolado foi identificado por PCR como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- Neste trabalho não foi evidenciado fatores que associem ao cão uma possível manutenção do parasita e conseqüente contaminação do vetor e transmissão para humanos.

9. REFERÊNCIAS

BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JR, G., MOMEN, H., McMAHONPRATT, D., RIBEIRO DE JESUS, A. ALMEIDA, R., BADARO, R., BARRAL-NETO, M., CARVALHO, E.M., JOHNSON, W.D. JR. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil : evidence that *Leishmania amazonensis* produce a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44, 536-546.

BUSATO, M.A., RIERA, M.C., GALLEGOS, M. & PORTÚS, M. (1999) Diagnóstico de leishmanioses en sueros del banco de sangre de Chapecó estado de Santa Catarina – Brazil. In *VI Congreso Ibérico de Parasitología*, Córdoba, Espanha, Resumos, p. 55.

CASTRO, E. A., LUZ, E., TELLES, F. Q., PANDEY, A., BISETO, A., DUNAISKI, M., SBALQUEIRO, I., THOMAZ SOCCOL, V. (2005) Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in ribeira valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica* 93 (2005) 141-149

CASTRO, E. A., THOMAZ-SOCCOL, V., MEMBRIVE, N., LUZ E., (2002). Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(5), 445-452.

CASTRO, E. A., (2001) Aspectos epidemiológicos e parasitológicos da leishmaniose tegumentar em duas regiões do estado do Paraná e o papel do cão na manutenção do ciclo de *Leishmania*. Curitiba, Brasil. Tese de doutorado, Universidade federal do Paraná, Departamento de Zoologia. 188p.

DEDET, J. P. (1993) *Leishmania* et Leishmanioses du Continent Américain. Bulletin Institute Pasteur.

FALQUETO, A., COURA, J., BARROS, C., GRIMALDI, G., SESSA, P., CARIAS, V. & ALENCAR, J. (1986) Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo.. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, 155-163.

FISA, R., RIERA, C., GÁLLEGO, M., MENUBENS, J., PORTÚS, M., (2001) Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary parasitology*. 99, 105-111

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (2000) Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Distrito Federal.

GRIMALDI, G. JR., MOMEN, H., NAIFF, R.D., McMAHON-PRATT, D., BARRET, T.V. (1991) Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41, 687-725.

GRIMALDI, G. e TESH, B.R. & McMAHON-PRATT, D. (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41, 687-725.

REY, L. (1991) Parasitologia Segunda edição. Guanabara Koogan.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1972) Leishmaniasis in the New World : Taxonomic problems. *British Medical Bulletin*, 28, 44-48

LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1989) *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annals Parasitologie Humaine et Comparée*, 64, 200-207.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1989) *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.n. a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazon Brazil. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64, 3-9

LAINSON, R. & SHAW, J.J (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. Killick-Kendrich, R. (Eds) The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Academic Press. London, p. 1-120.

LAISON, R., SHAW, J.J., SOUZA, A.A.A., SILVEIRA, F.T., BRAGA, R.R. & ISHIKAWA, E.A.Y. (1994), The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 435-443

MIMORI, T., SASAKI, J., NAKATA, M., GÓMEZ, E. A., UEZATO, H., NONAKA, S., HASHIGUCHI, Y., FURUYA, M. & SAYA, H., (1998) Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 210, 179 – 186.

MIRANDA, R.N., CUNHA, C. & SCHWEIDSON, J. (1955) A Leishmaniose Tegumentar no Paraná. *Revista Médica do Paraná*, 24 1-21

MODABBER, F. (1993) Tropical disease research : Progress 1991-92 eleventh programme report of the UNDP/WHO special Programme for Research (TDR). Geneva , WHO, p. 77-91

OLIVEIRA – NETO, M.P., PIRMEZ, C., RANGEL, E., SCHUBACH, A. & GRIMALDI JR., G. (1988) An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a

perirban area of Rio e Janeiro : clinical and epidemiological. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 83, 427 – 435.

ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTÉ (1990) *Lutte contre les leishmanioses*. Serie de reports techniques. OMS. Geneve, 793, 176p.

RIOUX, J. A., LANOTTE, G., SERRES, E., PRATLONG, F., BASTIEN, P. & PERIERES, J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzyme. Suggestions for a new classification. *Annals de Parasitologia Humaine et Comparée*. 65, 111 – 125

ROCHA E SILVA, E.O., CAPINZAIK, N.O., KURATOMI, C.O. & GUEDES, A.C.M., (1980) A leishmaniose tegumentar americana no litoral sul do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Malariologia e Dermatologia Tropical*, 32, 9-25

ROSS, E. (1903) Notes on the bodies recently described by leishmann and Donovan. *Britanic Medicine Journal*, 2, 1261 – 1262

SESA, P. A. ; FALQUETO, A. & VAREJÃO, J.B.M. (1994) *Attempted Control of Mucocutaneous Leishmaniasis Through Treatment of diseases Dogs*. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 10 (4) : 457-463, Oct/Dec.

SILVEIRA, F.T., SHAW, J.J., BRAGA, R.R. & ISHIKAWA, E.E.A. (1987) Derrmal leishmaniasis in the amazon region of Brazil : *Leishmania* (V.) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the state of Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 289-292.

SILVEIRA, T.G.V., TEODORO, U., ARRAES, S.M.A.A., LONARDONI, M.V.C., DIAS, M.L., SHAW, J., ISHIKAWA, E. & LAINSON, R. (1990) Na autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (L.) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 475-476

THOMAZ-SOCCOL, V. (1993) *Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les Leishmania de l'Ancien Monde*. Montpellier, France. These de doctorat, Médecine, 190 p.

THOMAZ-SOCCOL, V., CASTRO, E. A., LUZ, E., DEREURE, J., PRATLONG, F., MEBRIVE, N. & DEDET, J. P. (2003) *Leishmania* species in two regions of Paraná, Brazil : biochemical characterization by isoenzyme electrophoresis. *New Horizons in Biotechnology*. Kluwer Academic Publisers, Dordrecht, Holanda, 429 – 439 (Chapter 35).

YOSHIDA, E., CORREA, F., MARQUES, S., STOLF, H., DILLON, N., MOMEN, H. & GRIMALDI JR., G. (1990) Human, canine and equine leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of São Paulo state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 133-134.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha Individual de Notificação - SESA

FICHA DE INVESTIGAÇÃO

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2- Individual	2 Data da Notificação		
	3 Município de Notificação	Código (IBGE)		
	4 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código		
Dados do Caso	5 Agravado LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	Código (CID10) B 5 5 - 2	6 Data do Diagnóstico	
	7 Nome do Paciente	8 Data de Nascimento		
	9 (ou) Idade D - dias M - meses A - anos	10 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	11 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9-Ignorado	12 Escolaridade (em anos de estudo concluídos) 1-Nenhuma 2-De 1 a 3 3-De 4 a 7 4-De 8 a 11 5-De 12 e mais 6- Não se aplica 9-Ignorado
	13 Número do Cartão SUS	14 Nome da mãe		
	15 Logradouro (rua, avenida,...)	Código	16 Número	
Dados de Residência	17 Complemento (apto., casa, ...)	18 Ponto de Referência	19 UF	
	20 Município de Residência	Código (IBGE)	Distrito	
	21 Bairro	Código (IBGE)	22 CEP	
	23 (DDD) Telefone	24 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Urbana/Rural 9 - Ignorado	25 País (se residente fora do Brasil) Código	
	Dados Complementares do Caso			
Antecedentes Epidemiológicos	26 Data da Investigação	27 Ocupação / Ramo de Atividade Econômica		
	28 Deslocamento (datas e locais frequentados no período de seis meses anterior ao início dos sinais e sintomas)			
Dados Clínicos	29 Presença de Lesão 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	30 Em Caso de Presença de Lesão Mucosa, Há Presença de Cicatrizes Cutâneas 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		
	31 Parasitológico Direto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado	32 IRM 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado		
Clas. Caso	33 Histopatologia 1 - Encontro do Parasita 2 - Compatível 3 - Não Compatível 4 - Não Realizado 9 - Ignorado			
	34 Tipo de Entrada 1 - Caso Novo 2 - Recidiva 9 - Ignorado	35 Forma Clínica 1 - Cutânea 2 - Mucosa		
Tratamento	36 Data do Início do Tratamento	37 Droga Inicial Administrada 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada		
	38 Peso Kg	39 Dose Prescrita em mg/kg/dia Sb ⁵ 1 - < 10 2 - ≥ 10 < 15 3 - 15 4 - > 15 < 20 5 - 20 6 - > 20		
	40 N° Total de Ampolas Prescritas Ampolas	41 Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina b 3 - Pentamidina 4 - Outros 5 - Não Se Aplica		

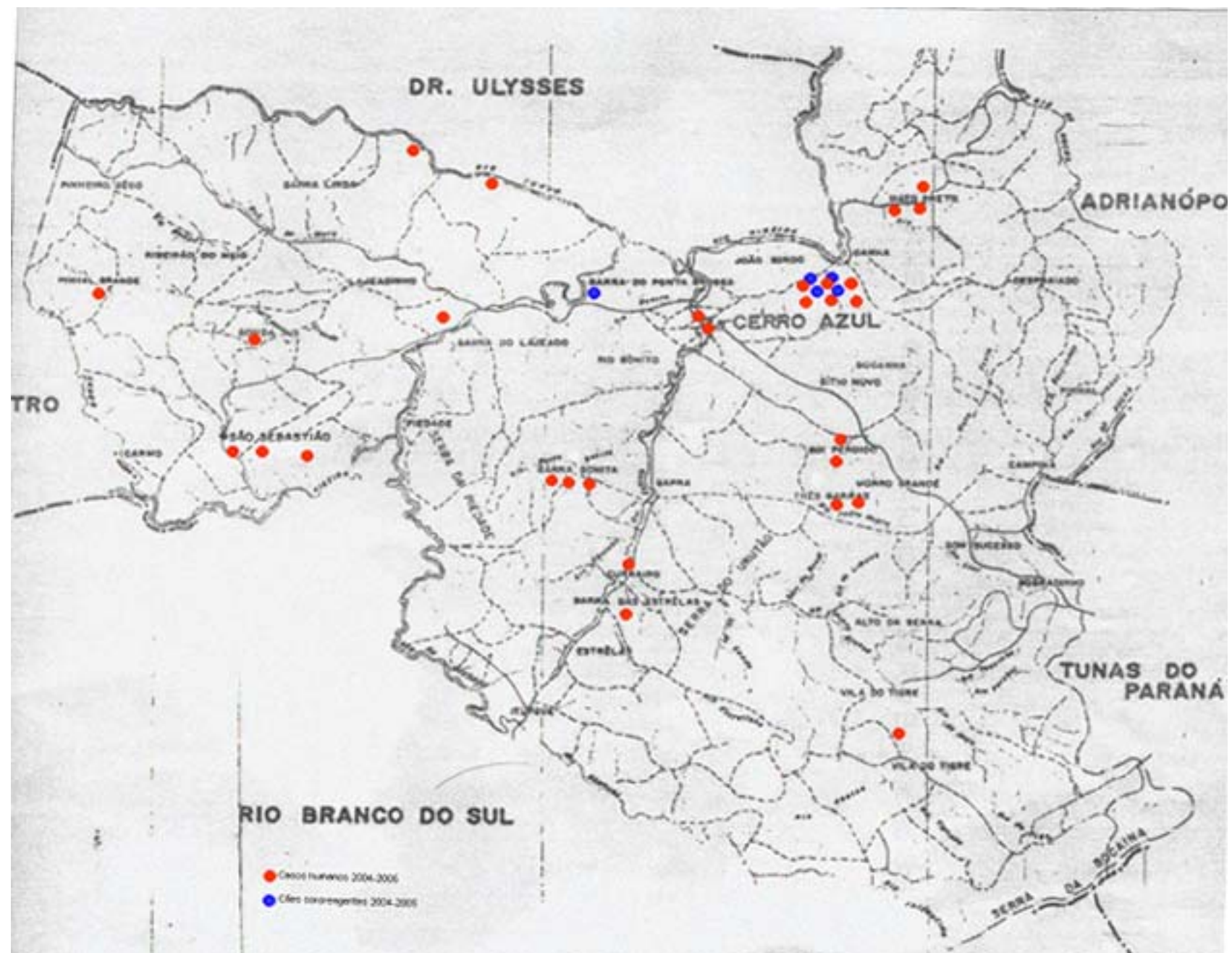
Dados Entomológicos	42 Local Investigado <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1-Rural 2- Urbano 3-Periurbano 4- Não se aplica 5- Não Pesquisado 9- Ignorado			43 Existência no Local da investigação : <input type="checkbox"/> Matas <input type="checkbox"/> Canavial <input type="checkbox"/> Bananal <input type="checkbox"/> Lixo Orgânico <input type="checkbox"/> Outros 1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 4 - Não Pesquisado 9 - Ignorado		
	44 Proximidade do local de investigação <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; display: inline-block;"></div> Metros			45 Presença de Flebotomíneo <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 4 - Não Pesquisado 9 - Ignorado		
	46 Se Afirmativo <input type="checkbox"/> Intradomicílio <input type="checkbox"/> Peridomicílio <input type="checkbox"/> Extradomicílio 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			47 Existência de Animais no Peridomicílio <input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> Equino <input type="checkbox"/> Outros 1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 4 - Não Pesquisado 9 - Ignorado		
	48 Existência de Animais com Lesão Aparente de Leishmaniose <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 4 - Não Pesquisado 9 - Ignorado			49 Espécies Capturadas de Flebotomíneos _____ Obs: _____		
	50 Possibilidade de Transmissão no Local Pesquisado <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			51 Indicação de Inseticida <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 4 - Não Pesquisado 9 - Ignorado		
Conclusão	52 Critério de Confirmação <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Laboratorial 2 - Clínico-Epidemiológico			53 O Caso é Autóctone da UF ? <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 3 - Indeterminado 9 - Ignorado		
	54 Autóctone do Município de Residência <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 3 - Indeterminado 9 - Ignorado			55 Importado <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Outros Países 2 - Outra UF 3 - Outro Município		
	Local Provável de Fonte de Infecção					
	56 UF <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block;"></div>		57 País _____		58 Município _____	
	59 Bairro _____		60 Distrito _____		61 Doença Relacionada ao Trabalho <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
62 Evolução do Caso <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1 - Alta por Cura 2 - Abandono 3 - Óbito 4 - Transferência 9 - Ignorado			63 Data do Óbito <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; display: inline-block;"></div>		64 Data do Encerramento <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; display: inline-block;"></div>	
Observações: <div style="border: 1px solid black; min-height: 80px;"></div>						
Investigador	65 Município/Unidade de Saúde _____			66 Código da Unid. de Saúde <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; display: inline-block;"></div>		
	67 Nome _____		68 Função _____		69 Assinatura _____	

Anexo 2. Mapa do Município de Adrianópolis

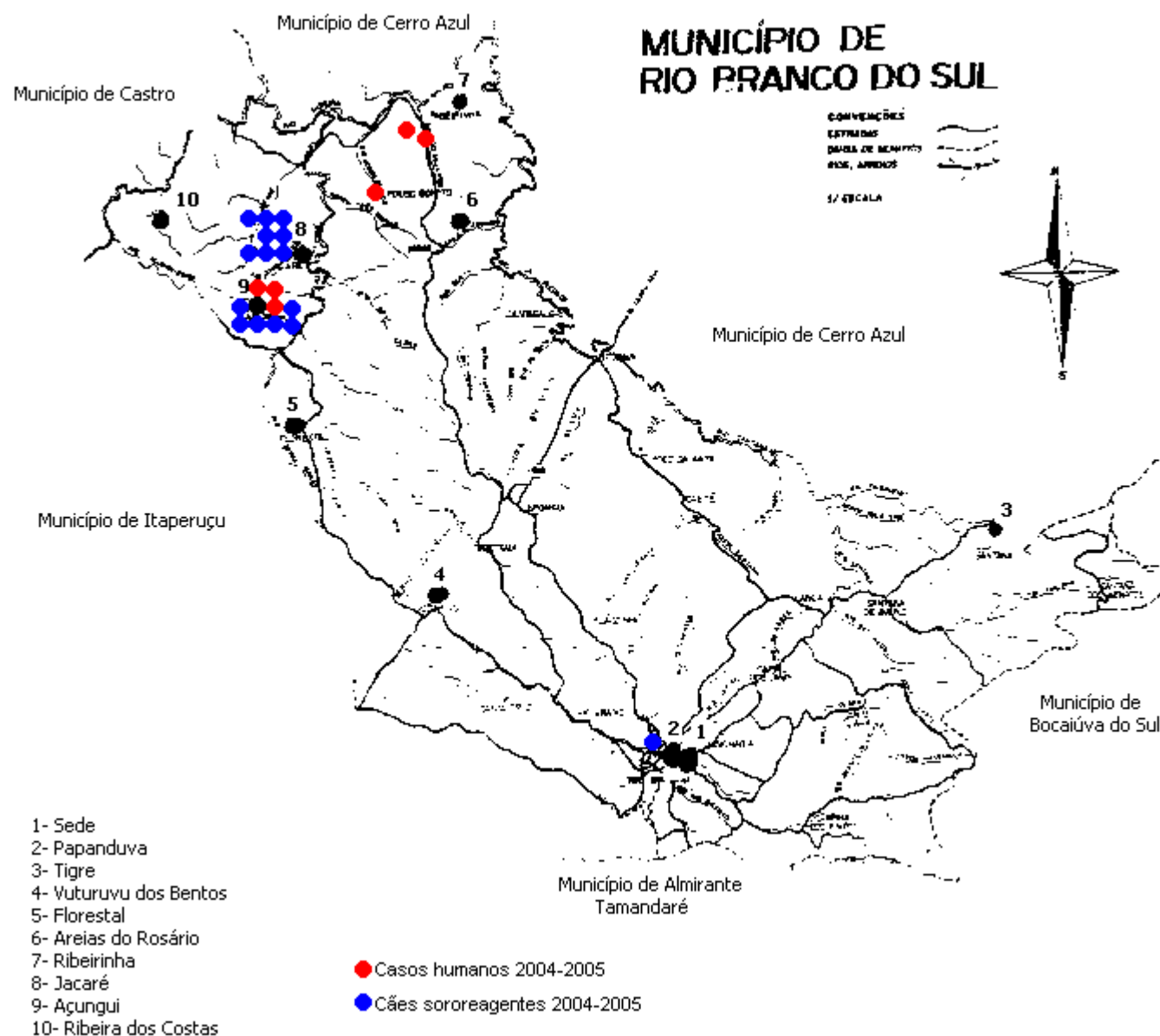


● Casos humanos 2004-2005 ● Cães sororeagentes 2004-2005

Anexo 3. Mapa do Município de Cerro Azul



ANEXO 4. Mapa do Município de Rio Branco do Sul



ANEXO 5. Resultados Teste Qui Quadrado nos Cães Examinados

RESULTADOS – QUI QUADRADO CÃES NOS MUNICÍPIOS ESTUDADOS

Adrianópolis x Cerro Azul

	Adria	Cerro Azul	Total
reagentes	25	5	30
não reagentes	150	30	180
Total	175	35	210

Degrees of freedom: 1

Chi-square = 0

For significance at the .05 level, chi-square should be greater than or equal to 3.84.

The distribution is not significant.

p is less than or equal to 1.

Adrianópolis x Rio Branco do Sul

	Adria	RBS	Total
reagentes	25	15	40
não reagentes	150	74	224
Total	175	89	264

Degrees of freedom: 1

Chi-square = 0.302682870901169

For significance at the .05 level, chi-square should be greater than or equal to 3.84.

The distribution is not significant.

p is less than or equal to 1.

Cerro Azul x Rio Branco do Sul

	Cerro Azul	RBS	Total
reagentes	5	15	20
não reagentes	30	74	104
Total	35	89	124

Degrees of freedom: 1

Chi-square = 0.122484257315718

For significance at the .05 level, chi-square should be greater than or equal to 3.84.

The distribution is not significant.

p is less than or equal to 1.